

Itämereen upotetut arseenia sisältävät kemiaalliset taisteluaineet ja niiden analyysimenetelmät

Niklas Isomäki
Maisterintutkielma
Kemian ja molekyyli­tieteen maisteriohjelma
VERIFIN
Kevät 2021
Ohjaaja: Hanna Niemikoski ja Paula Vanninen
Vastu­uopettaja: Prof. Mikko Oivanen

Tiedekunta – Fakultet – Faculty		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree programme
Matemaattis-luonnontieteellinen		Kemian ja molekyyli-tieteen maisteriohjelma
Opintosuunta – Studieriktning – Study track		
Tekijä – Författare – Author		
Niklas Isomäki		
Työn nimi – Arbetets titel – Title		
Itämereen upotetut arseenia sisältävät kemialliset taisteluaineet ja niiden analyysimenetelmät		
Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages
Maisterintutkielma	25.04.2021	70
Tiivistelmä – Referat – Abstract		
<p>Tässä maisterintutkielmassa keskitytään Itämereen upotettuihin arseenia sisältäviin kemiallisiin taisteluaineisiin ja niiden analysoinnissa käytettäviin erilaisiin analyysimenetelmiin ja erilaisiin näytematriiseihin.</p> <p>Analyysimenetelmät ovat pääosassa olleet kromatografisia ja massaspektrometrisiä menetelmiä. Tutkielmassa syvennytään lisäksi aseiden upotusalueisiin sekä käydään läpi hieman taustatietoa yhdisteistä ja historiaa aseiden upottamisesta.</p> <p>Maisterintutkielmassa tarkastellaan lisäksi upotettujen kemiallisten aseiden toksisuutta ja mahdollisia vaikutuksia ympäristöön ja eliöihin, sekä myös upotettujen aseiden mahdollista riskiä ihmiselle.</p> <p>Tutkielman loppuun sijoittuva kokeellinen osio sisältää VERIFINillä tehdyn menetelmän kehityksen difenyyliarsiinihapon glutationikonjugaatin määrittämiseksi turskan sapesta. Kokeellinen osuus sisältää menetelmän validoinnin sekä varsinaisten upotusalueäytteiden analysoinnin liittyen DAIMON-projektiin.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords		
Kemialliset taisteluaineet, HPLC-MS, GC-MS, VERIFIN, Difenyyliarsiinihappo.		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited		
Helsingin yliopiston digitaaliset arkistot/E-Thesis		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		
Tutkielman kokeellinen osuus suoritettiin syksyllä ja keväällä 2018-2019 Hanna Niemikosken ohjauksessa VERIFIN-laboratoriossa Helsingin yliopistolla Kumpulan kampuksella.		

Kiitokset

Kiitokset VERIFIN-tutkimuslaboratoriolle, sen johtajalle professori Paula Vanniselle ja graduohjaajalleni Hanna Niemikoskelle, jotka mahdollistivat tutkimusprojektini suorittamisen. Kiitokset professori Mikko Oivaselle, joka toimi vastuuopettajanani tässä pro gradu -tutkielmassa. Oli myös ilo olla osana suurempaa EU:n alaista DAIMON-projektia, johon usean alan asiantuntijat eri maista osallistuivat.

Sisällys

1. Lyhenteet	6
2. Johdanto	7
3. Upotetut kemialliset taisteluaineet	8
3.1. Erilaiset yhdisteet	8
3.2. Historia	10
3.3. Itämereen upotetut taisteluaineet	14
4. Upotettujen kemiallisten aseiden analyysimenetelmät	17
4.1. Yhteenvetoa artikkeleista	31
5. Upotettujen taisteluaineiden ympäristövaikutukset	32
5.1. Yhdisteiden toksisuus	33
5.2. Toksisuuden ilmentyminen eliöissä	37
5.3. Mahdolliset vaikutukset ympäristölle	38
5.4. Eliöt	39
5.5. Riski ihmisille	40
6. Pohdintaa ja avoimia kysymyksiä	43
Kokeellinen osuus	44
7. Johdanto	44
8. Menetelmät	45
8.1. Analyysilaitteisto	45
8.2. Analyytit	46
8.3. MS/MS-menetelmän tekeminen ja valitseminen	47

8.4.	Matriisi.....	50
8.5.	Ongelmat	50
8.6.	Carryover-ongelma.....	51
8.7.	Lämpötilakoe.....	51
8.8.	Projektin suunnittelu.....	52
8.9.	Dikloorimetaani	54
8.10.	Kiinteäfaasikokeet.....	54
8.11.	Ulossuolaus	63
8.12.	Lopullinen näytteenkäsittelymenetelmä	64
8.13.	Validointi.....	65
9.	Tulokset	67
9.1.	Validointitulokset	67
9.2.	Näytteiden analysointi	69
9.3.	Löydökset	70
10.	Yhteenveto	72
11.	Lähdeluettelo	73

1. Lyhenteet

APCI	normaali-ilmanpaineessa tapahtuva kemiallinen ionisaatio
ACN	asetonitrili
BDPAO	bis(difenyyliaarsiini)oksidi
CHEMSEA	Chemical Munitions, Search and Assessment
CLARK I, DA	Difenyylidiklooriaarsiini
CLARK II, DC	Difenyylisyanoarsiini
CNS	Keskushermostoon vaikuttava
CWA	Chemical Warfare Agent, Kemiallinen taisteluaaine
DAIMON	Decision aid for marine munitions
DCM	dikloorimetaani
DM[ox]	adamsiitin hapettunut muoto
DPA, DPAA	difenyyliaarsiinihappo
DPA[ox]	difenyyliaarsiinihapon hapettunut muoto
DPA-SG	difenyyliaarsiinihapon glutationikonjugaatti
ESI	sähkösumutusionisaatio
GSH	glutationi
HCl	suolahappo
HCOOH	muurahaishappo
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
HRMS	korkean resoluution massaspektrometria
HS	Headspace
ICP	induktiivisesti kytketty plasma
LC	nestekromatografia
LC-MS	nestekromatografia-massaspektrometria
MeOH	metanoli
MODUM	Towards the Monitoring of Dumped Munitions Threat
MS	massaspektrometria
MS/MS	tandemmassaspektrometria
NMR	NMR-spektroskopia
OPCW	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons
PAA	fenyyliarsonihappo
PDA, PDCA	fenyylidiklooriaarsiini
SPE	kiinteäfaasiuutto
TOF	lentoaika-analysointori
TPA	trifenyyliaarsiini
TPA[ox]	trifenyyliaarsiinin hapettunut muoto
UPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia

2. Johdanto

Tässä pro gradu -tutkielmassa keskitytään mereen upotettuihin kemiallisiin taisteluaineisiin ja upotusalueisiin, käydään läpi hieman taustatietoa ja historiaa siitä, miksi ja miten taisteluaineet päätyivät mereen upotetuiksi. Tässä tutkielmassa taisteluaineet rajautuvat vain arseenia sisältäviin kemiallisiin aseisiin.

Tutkielmassa selvitetään upotettujen kemiallisten aseiden mahdollisia vaikutuksia ympäristöön ja eliöihin. Lisäksi pohditaan myös upotettujen aseiden mahdollista riskiä ihmiselle.

Tutkielman loppuun liitetty kokeellinen osa sisältää VERIFIN-laboratoriossa tehdyn menetelmän kehityksen difenyyliarsiinihapon glutationikonjugaatin määrittämiseksi turskan sapesta. Kokeellinen osuus sisältää menetelmän validoinnin sekä varsinaisten upotusalueäytteiden analysoinnin liittyen DAIMON-projektiin.

Tutkielman kokeellinen osuus suoritettiin syksyllä ja kevättalvella 2018-2019 Hanna Niemikosken ohjauksessa VERIFIN-laboratoriossa Helsingin yliopistolla Kumpulan kampuksella.

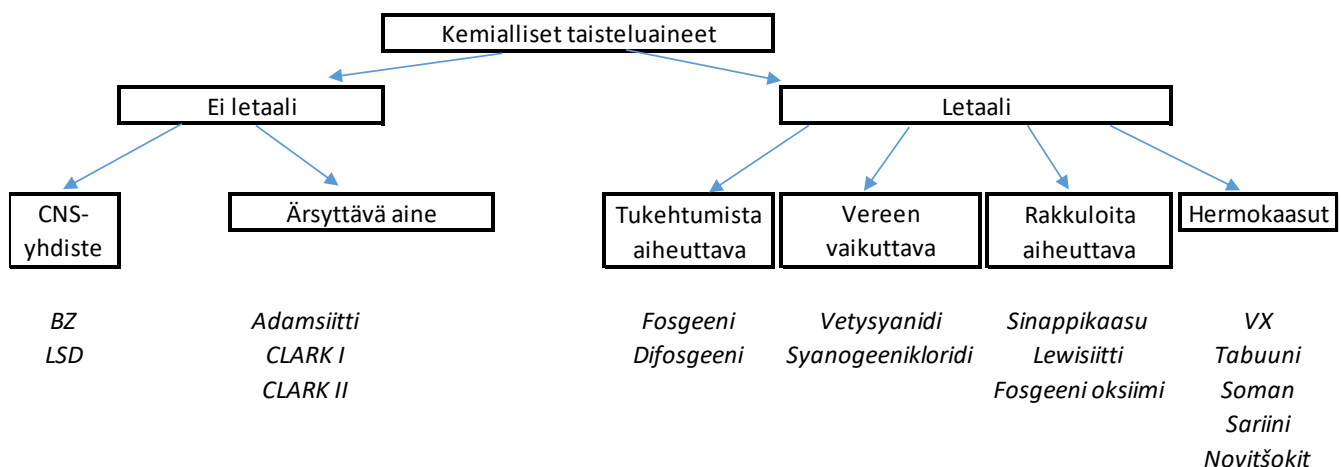
Merenpohjan tilan ja arseenipitoisten sekä muiden kemiallisia aseita sisältävien upotettujen sodanajan ammusten tutkimiseksi on tehty monia erilaisia yhteisiä projekteja. Esimerkiksi CHEMSEA- sekä sitä edeltänyt MODUM-projekti (Towards the Monitoring of Dumped Munitions Threat). Osa projekteista on jo päättynyt ja osa jatkuu edelleen. Uusia projekteja on varmasti näkyvillä tulevaisuudessa. Olin itse osana DAIMON-projektia pro gradu -tutkielmani aikana. (Decision aid for marine munitions), joka oli EU:n alainen projekti, johon ottivat osaa eri osalueiden ammattilaiset eri EU-jäsenvaltioista.

3. Upotetut kemialliset taisteluväineet

Jotta voidaan ymmärtää ja tehdä tärkeäksi se, miksi mereen upotettuja kemiallisia aseita tutkitaan, täytyy ensin tietää jotain kemiallisista aseista, niiden historiasta ja siitä, miksi, miten ja minne niitä on päätynyt. Tässä luvussa kerrotaan kemiallisten aseiden käytön historiasta ja siitä, minkä tyyppisiä aseita on käytetty. Selvennän sitä, miksi aseet ovat päätyneet meriin, ja minne kaikkialle niitä on upotettu. Käytän karttoja, taulukoita ja kaavioita asioiden selventämiseksi ja havainnollistamiseksi.

3.1. Erilaiset yhdisteet

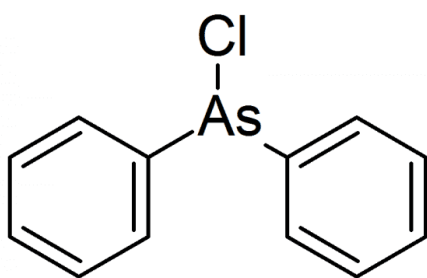
Sodankäynnin kemiallisia aseita on monenlaisia. Ne jaotellaan erilaisiin ryhmiin. Aiheen rajaamiseksi ja spesifisyydessä pysymiseksi tässä tutkielmassa tarkastellaan vain arseenia sisältäviä kemiallisia aseita. Ne luokitellaan mellakantorjunta-aseisiin. Ne eivät siis ole sariinin tai VX:n kaltaisia tappavia kemiallisia aseita. Kuvassa 1 on havainnollistettu kemialliseen sodankäyntiin tarkoitettujen kemikaalien luokittelua. Kaaviosta huomataan, kuinka aseet



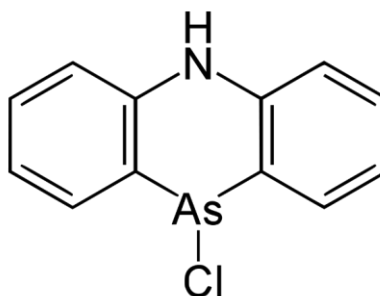
Kuva 1 Erilaisista kemiallisista aseista ja niiden yhdisteryhmistä.

luokitellaan tappaviin aseisiin ja sellaisiin, jotka vain lamauttavat ja tekevät kohteensa toimintakyvyttömäksi.

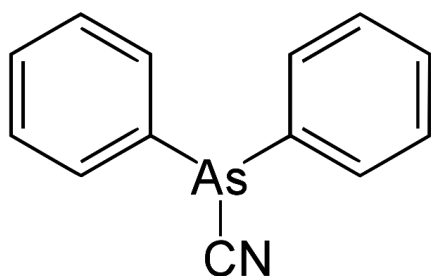
Arseenia sisältäviä kemiallisia taisteluaaineita ovat muun muassa difenyyliklooriarsiini (CLARK I), difenyylylsyanoarsiini (CLARK II) sekä adamsiitti ja lewisiitti. Yhdisteiden rakennekaavat ovat esitettynä alla. 1 difenyyliklooriarsiini, 2 adamsiitti, 3 difenyylylsyanoarsiini ja 4 lewisiitti. Pääasiallisesti jokaisessa yhdisteessä on kolmenarvoinen arseenimolekyyli, johon on liittynyt fenyyliryhmiä, yksi tai useampi klooriatomi tai hiiliatomi.



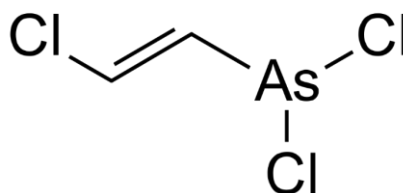
1



2



3



4

Adamsiitin, CLARK I ja CLARK II:n rakenteissa huomataan samankaltaisuuksia. Arseenimolekyyliin on liittynyt kaksi fenyyliryhmää muodostaen difenyyliarsiinirakenteen. Tähän rakenteeseen on lisäksi kolmenarvoiseen arseeniatomiin liittynyt joko klooriatomi, jolloin

muodostuu difenyyliklooriarsiini eli CLARK I, tai syanoryhmä, jolloin muodostuu difenyyლისyanoarsiini eli CLARK II. Adamsiitin molekyyli­rakenteessa on nähtävissä CLARK I:den molekyyli­rakenne mutta siinä on lisäksi fenyyliryhmien välillä rakenteessa sekundäärinen amiini. Suurimman rakenteellisen eroavaisuuden tekee lewisiitti, joka ei ole rakenteeltaan lainkaan Adamsiitin tai CLARK I:n tai CLARK II:n kaltainen. Lewisiitin eli kloorivinyylidiklooriarsiinin rakenteessa ei ole lainkaan fenyyliryhmiä, vaan se koostuu kaksoissidoksellisesta kaksihiilisestä hiilivetyketjusta, jossa toiseen hiileen on liittynyt klooriatomi ja toiseen hiileen kolmenarvoinen dikloorattu arseeniatomi.

3.2. Historia

Ensimmäisessä ja toisessa maailmansodassa kehiteltiin ja käytettiin kemiallisia aseita sodankäynnin välineenä. Maailmansotien aikana valmistettiin huomattavia määriä kemiallisia aseita sodankäyntiin. Pelkästään ensimmäisen maailmansodan aikana valmistettiin 130 000 tonnia erilaisia kemiallisia aseita. ¹ Toisen maailmansodan aikana valmistettuja kemiallisia aseita ja niiden valmistusmääriä on esitetty taulukossa 1. ² Maailmansotien jälkeen sotiin tarkoitettuja varastoituja kemiallisia aseita päätettiin upottaa mereen.

Kemialliset aseet edustivat sodan aikana kemian kehitystä ja olivat uudenlaista sodankäyntiä, ns. kemistien sota. Sotien alussa kokeiltiin mm. kyynelkaasutäytteisiä kranaatteja, ksylylibromidia sekä dianisidikloorisulfaattia. 1914 kuuluisa kemisti nimeltä Fritz Haber ehdotti kloorikaasun käyttämistä sotarintamalla. ² Jo vuonna 1915 Ypresissä Belgiassa saksalaiset käyttivätkin kloorikaasua ensimmäistä kertaa sotatilanteessa brittejä ja ranskalaisia sotilaita vastaan. ² Myös fosgeenia pidettiin tuohon aikaan kloorikaasun lisäksi hyvänä taistelukaasuna. Kaasunaamareiden kehittyessä kloori- ja fosgeenikaasun käyttö väheni, minkä seurauksen sinappikaasun käyttö alkoi. Yhdysvaltojen tullessa mukaan sotaan 1917 alkoi kemiallisten aseiden systemaattinen kehittäminen sodankäynnin välineinä.

Kohti modernimpia kemiallisia aseita

Ensimmäisen maailmansodan esimerkit kauheista kemiallisista aseista ja niiden käytöstä valmistelivat kansakuntia laajempaan kemialliseen sodankäyntiin. Toisen maailmasodan syttyessä oli varmaa, että kemiallisia aseita tultaisiin käyttämään enemmän ja laajemmin. Myös pelko uudentlaisista ja vaarallisemmista kemiallisista taisteluaineista oli vahvasti läsnä. Kemiallisia aseita – esimerkiksi fosgeenia ja sinappikaasua, käytettiin myös maailmansotien välillä mm. Rifin sodan aikana Ranskan ja Espanjan toimesta. ³ Myös Italia ja Japani käyttivät sodankäyntinsä välineinä kemiallisia aseita maailmansotien välillä. ^{2,4}

Arseenipitoiset kemialliset aseet

Arseenipitoisten kemiallisten taisteluaineiden historia alkaa spartalaisten ajalta 431-404 eaa., jolloin arseenipitoista savua käytettiin sodankäynnin välineenä. Kiinalaiset kehittivät savuavan pallomaisen ase, joka sisälsi arseenioksidia As_2O_3 . ³ Arseenioksidin katsotaan olevan prekursori nykyisille arseenipohjaisille kemiallisille taisteluaineille ⁴.

Arsiinin eli arseenivedyn AsH_3 käyttöä sodankäynnissä pohdittiin, mutta sen käyttö kariutui arsiinin syttymisherkkyyteen. Orgaanisista arseeniyhdisteistä ensimmäisiä varteenotettavia vaihtoehtoja oli etyyliklooriarsiini, jolla huomattiin olevan ihoa sekä hengitysteitä ärsyttäviä ominaisuuksia. Myös metyyli- ja fenyyliklooriarsiini kehitettiin Euroopassa samoihin aikoihin 1917 – 1918. ³

Myöhemmin esille nousivat difenyyliklooriarsiini sekä difenyyliisyyanoarsiini. Kaasumaiset aineet kuten kloori sekä fosgeeni olivat sodankäynnissä yleisiä 1915, mutta kaasunaamareiden kehittyessä uudentlaisille kaasumaisille aineille oli tarvetta. Difenyyliklooriarsiini sekä difenyyliisyyanoarsiini kehitettiin ajatellen, että ne läpäisisivät kaasunaamarit ja olisivat lisäksi ärsyttäviä myös iholla. ²

Adamsiitti

Adamsiittia tutkivat 1915 saksalainen kemisti Heinrich Wieland, brittiläinen tutkimusryhmä sekä Yhdysvaltojen armeija, joka nimesi sen myöhemmin adamsiitiksi. Oksennusta, kurkun ja hengitysteiden ärsytystä aiheuttavaa adamsiittiä käytettiin tiettävästi brittiarmeijan toimesta bolsevikkeja vastaan Venäjän sisällissodan aikana 1919. Japani käytti luultavasti adamsiittiä CLARK II:n lisäksi myös toisen maailmansodan aikana. Japanin tiedetään käyttäneen suuria määriä ko. yhdisteitä.⁴

Lewisiitti

Lewisiitti eli kloorivinyylidiklooriarsiini kehitettiin 1918 Yhdysvalloissa.⁴ Lewisiitti on hengitysteitä ärsyttävien ominaisuuksiensa lisäksi myös iholla vesikelloja ja rakkuloita sinappikaasun tapaan aiheuttava yhdiste. Lewisiittiä ei kuitenkaan käytetty ensimmäisessä maailmansodassa, ja muutoinkin sen käyttö sotatilanteissa on ollut harvinaista. Vaikkakin lewisiittiä valmistettiin suuriakin määriä sodankäyntiin tarkoitetuksi, jäi lewisiitin rooli kemiallisessa sodankäynnissä ylipäätään vähäiseksi.⁴ Lewisiitti on kuitenkin tärkeässä roolissa mereen upotettuna kemiallisena aseena.⁵

CLARK I ja CLARK II

Hengitysteitä voimakkaasti ärsyttävät ja aivastuksia aikaansaavat yhdisteet CLARK I sekä CLARK II koettiin potentiaalisiksi yhdisteiksi sotarintamalla. CLARK II:ta valmistettiin suuret määrät sodankäyntiin ensimmäisen maailmansodan aikana. Niitä pystyttiin levittämään ilmaan hienoina aerosoleina, jotka siten lävistäisivät kaasunaamarit ja tekisivät sotilaat hetkeksi toimintakyvyttömiksi sekä aiheuttaisivat pakonomaisen tarpeen riisua kaasunaamari, jolloin sotilaat olivat alttiina muille kaasumaisille kemiallisille aseille rintamalla. Saksa käytti CLARK I:tä venäläisiä vastaan Uexhuellissä 1917.⁴ Difenyylisianoarsiini eli CLARK II keksittiin difenyylidiklooriarsiinin pohjalta saksalaisten toimesta. CLARK II on voimakkaampaa kuin CLARK I.

Yleisesti voitaneen kuitenkin todet, ettei CLARK I:n tai II:n käyttö rintamalla ollut täysin onnistunutta, eikä täyttää haluttua vaikutusta onnistuttu saavuttamaan.

Saksalaisista arkistotiedoista voidaan päätellä Saksan valmistaneen yhteensä yli 62 000 tonnia erilaisia kemiallisia aseita sodankäynnin välineiksi. Taulukossa 1 havainnollistetaan kemiallisten taisteluaineiden valmistusmääriä Saksassa toisen maailmansodan aikana. Taulukosta huomataan arseenipitoisia aseita valmistetun pelkästään Saksassa monia tuhansia tonneja. ¹

Taulukko 1 Saksassa toisen maailmansodan aikana valmistettujen taisteluaineiden määriä ¹

Yhdiste	Määrä (tonnia)
Klooriasetofenoni	7100
Clark I	150
Clark II	100
Adamsiitti	3900
Arsiiniöljy	7500
Fosgeeni	5900
Sinappikaasu	25000
Sinappikaasun tyypianalogi	2000
Tabuuni	12000
Yhteensä	65000

Taulukossa mainitaan arsiiniöljy eli tekninen CLARK I, jonka sekoitussuhde on noin 50 % fenyyliklooriarsiinia, 35 % difenyyliklooriarsiinia, 5 % trifenyyliarsiinia ja 5 % arseenitrikloridia. Arsiiniöljyä käytettiin yhdessä sinappikaasun kanssa sen jäätymispisteen alentamiseen. ⁶

3.3. Itämereen upotetut taisteluaineet

HELCOMin raportin ⁵ (Helsinki Commission Baltic Marine Environment Protection Commission) sekä vuoden 1994 CHEMU-raportin perusteella on tutkittu ja vahvistettu, että 40 000 tonnia kemiallisia aseita ja kemiallisen sodankäynnin materiaaleja on upotettu Itämereen. Näistä materiaaleista noin 15 000 tonnia on itse kemiallisia taisteluaineita. Laivoista oli tapana heittää kemikaalisiilot yli laidan osoitetussa upotuskohteessa, mutta kemikaalisiiloja vieritettiin meriin myös matkalla upotusalueelle. Siksi upotetut kemialliset aseet ovat jakaantuneet isommalle alueelle. Edelleen kuitenkin on epäselvyyksiä tarkoista alueista, määrästä ja siitä, mitä on upotettu minnekin.

Kemiallisia aseita on upotettu myös muualla maailmassa esimerkiksi Yhdysvaltojen itä- ja etelärannikolle ⁷, Pohjois-Venäjälle arktiselle alueelle ⁸, jokiin Kiinassa ⁹, Japanin rannikolle ¹⁰ ja Havaijille ^{11 12} sekä Australian rannikolle ¹³.

Sotien loputtua kemiallisia aseita upotettiin Itämereen. Taulukossa 2 on listattuna Bornholmin itäpuolelle upotettuja erilaisia kemiallisia aseita sekä niiden määriä. Bornholmin alue luetaan suurimpaan upotusalueeseen Itämerellä. Taulukosta 2 huomataan, että aseita on lukuisia erilaisia. Joukossa on runsaasti arseenipitoisia kemiallisia aseita kuten CLARK I:tä, trifenyliarsiinia, fenyyliidiklooriarsiinia, triklooriarsiinia. Joukossa on myös sinappikaasua, jota on upotettu yli 7000 tonnia, klooriasetofenonia, jota on käytetty mellakantorjunta-aineena, sekä keskitysleireillä käytettyä Zyklon B:tä eli vetysyanidia. Taulukosta 2 sekä raportista ⁵ nähdään, että sinappikaasua on kuitenkin upotettu meriin suurin määrä upotetuista kemiallisista aseista.

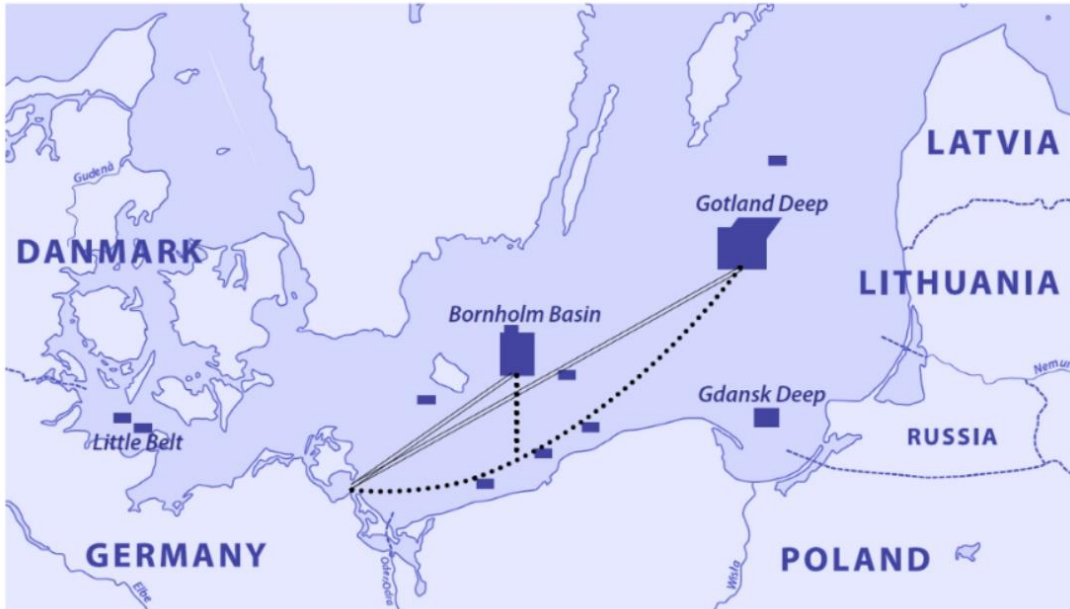
Taulukko 2 Bornholmin itäpuolelle varmistetusti upottujen kemiallisten aseiden määriä ¹⁴

Yhdiste	Upotettu määrä (tonnia)
Klooriasetofenoni	515
Sinappikaasu	7027
Adamsiitti	1428
Clark I	711,5
Trifenylylarsiini	101,5
Fenyylidiklooriarsiini	1017
Triklooriarsiini	101,5
Zyklon B (HCN)	74
Monoklooribentseeni	1405

Tiedossa olevia pääasiallisia upotusalueita Itämeren alueella ovat esimerkiksi Gotlannin syväne, Skagerrakin alue, Gdanskin syväne, Vähä-Beltin alue sekä Bornholmin syväne. Kuva 2 havainnollistaa eri upotusalueita Itämeren eri osissa.

Esimerkiksi Skagerrakiin upotettujen kemiallisten aseiden määrä on raportoitu olevan 160 000 tonnia. Skagerrakiin upotetut aseet koetaan turvallisemmiksi ympäristölle ja esimerkiksi kalastajille johtuen Skagerrakin suuresta syvyydestä ¹

Kemiallisia aseita on niiden upottamisen lisäksi päätynyt merenpohjiin sellaisissa tapauksissa, joissa niitä kuljettanut sotalaiva on uponnut tai upotettu. Esimerkiksi 1945 norjalaiset viranomaiset antoivat luvat upottaa kemiallisia taisteluaaineita sisältäviä laivoja. ¹



Kuva 2 Kemiallisten aseiden upotusalueita Itämerellä ja Skagerrakin alueella ¹⁵

Upottamisen haitat ja ongelmat

Kemiallisten taisteluaineiden sisältämät siilot ovat ongelmallisia merenpohjassa, koska ajan saatossa ne saattavat korroosion vaikutuksesta syöpyä ja hajota jopa täysin puhki. Tämä aiheuttaa suuren riskin sille, että siilossa oleva kemikaalisisältö vuotaa ympäristöön. ⁵

On todistettu, että vuotaessaan kemialliset aseet joko painuvat ympärillä olevaan sedimenttiin tai siirtyvät mahdollisten antropogeenisten prosessien vaikutuksesta muualle vesiympäristöön. Veden luonnolliset virtaukset myös aiheuttavat mahdollisen vuotaneen kemikaalin liikkumista ja hajaantumista upotusalueelta vesiympäristöön. Antropogeenisillä prosesseilla voidaan tarkoittaa ihmisten aiheuttamaa merenpohjan muokkausta, ruoppausta tai siitä kalastamista. Esimerkiksi Nord Stream -kaasuputkihankkeen aikana ¹⁶ pohdittiin riskejä liittyen upotettuihin aseisiin putken rakennusreitillä.

4. Upotettujen kemiallisten aseiden analyysimenetelmät

Upotettujen kemiallisten aseiden ympäristövaikutuksia ei voida tutkia, eikä niistä voida päästä varmuuteen, ellei kemiallisia aseita pystytä analysoimaan modernin analyttisen kemian keinoin. Analyttisen kemian tehokkaat analyysimenetelmät sekä vankka orgaanisen kemian osaaminen ovat ensiarvoisen tärkeitä uusia analyysimenetelmiä kehitettäessä ja optimoitaessa.

Analyysimenetelmiä on lukuisia erilaisia, ja jokaiselle analyyttille ja matriisille analyysimenetelmä, laitteisto ja näytteenkäsittely on hieman erilainen. Taulukossa 3 on esitetty erilaisia analyyttejä ja näyttematriiseja sekä niiden analysointiin ja tunnistamiseen käytettyjä menetelmiä sekä niihin liittyviä parametreja taulukkoon 3.

Taulukon tarkoituksena on havainnollistaa kokonaiskuvaa siitä, mitä yhdisteitä on milloinkin analysoitu, millaisilla menetelmillä sekä millaisista paikoista ja matriiseista.

Seuraavaksi perehdytään tutkimusartikkeleihin, joissa on tutkittu mereen upotettuja, kaivoveteen joutuneita tai maaperään päätyneitä arseenia sisältäviä kemiallisia aseita erilaisilla analyttisillä menetelmillä. Työssä keskitytään pääasiassa arseenia sisältävien kemiallisten aseiden, Clark I:n, Clark II:n, lewisiitin, adamsiitin sekä hydrolyysituote difenyyliarsiinihapon analyysimenetelmiin. Maaperänäytteiden lisäksi kemiallisia taisteluaineita tai niiden hydrolyysituotteita on myös analysoitu kalanäytteistä sekä muista merenelävistä. Analyysejä on lisäksi tehty laboratorio-olosuhteissa erilaisissa biologisissa altistuskokeissa.

Olen siksi jakanut artikkelit matriisin mukaan siten, että ensiksi käsittelen ei-biologiset matriisit eli sedimentti-, ilma-, porevesi- ja maaperänäytteisiin keskittyvät tutkimusartikkelit ja lopuksi biologisia matriiseja käsittelevät tutkimusartikkelit.

Taulukko 3 Koostetaulukko analyysimenetelmistä

Lähde no.	Analyytit	Näyttematriisi	Analyysialue	Analyysimenetelmä	Derivatisointi	Esikäsittely/menetelmä/lisätiedot	Ionisaatio	Reaktiot
	Ei-biologiset							
17.	Clark 1, Fenyyliklori-arsiini, TPA	Sedimentti ja porevesi	Bornholmin syväne, Gdanskin syväne	HS-SPME-GC-MS/MS	-	Headspace, SP mikroekstraktio	EI, +	SRM
18.	Organoarseeniyhdisteet	Porevesi	Gotlannin ja Gdanskin syväne	SPME-GC-MS/MS	-	SP mikroekstraktio	-	MRM
16.	CWA-yhdisteet	Sedimentti ja porevesi	Bornholmin syväne	GC-MS, LC-MS-MS	Tioliderivatisointi/H ₂ O ₂	-	EI, APCI	MRM
19.	CWA-yhdisteet	Sedimentti	Bornholmin syväne	GC-MS, LC-MS-MS	Tioliderivatisointi	-	EI, APCI	MRM
20.	CWA-yhdisteet	Sedimentti	Bornholmista itään	GC-MS, LC-MS	-	-	-	SIM, MRM
1.	Organoarseeniyhdisteet	Sedimentti	Skagerrak	GC-MS	Tioliderivatisointi/H ₂ O ₂	-	-	-
21.	DPAA ja PAA	Maaperä	Yujiangin maakunta, Changchungin kaupunki. Jiangsun maakunta, Nanjingin kaupunki.	HPLC-MS/MS	-	Liutinekstraktio	ESI/APCI, +	SRM
22.	Difenyyliarseeniyhdisteet	Kaivovesi ja Maaperä	Kamisu-chon kaupunki, Samukawa-chon ja Hiratsukan kaupunki, Japani	GC/LC	Tioliderivatisointi	-	EI, +/ APCI +	-
23.	Arseniitti, PAO, PAA, DPAA	Kaivovesi	Kamisu-chon kaupunki, Japani	HPLC-ICP-MS	-	ICP	ESI-TOF	-
6.	Fenyyliarseeniyhdisteet	Sedimentti	Itämeren upotusalueet	UPHLC-HRMS	H ₂ O ₂	-	HESI +	HCD
25.	Lewisiitit	Nestemäinen ja kostea	-	GC-MS	Butyylioliolaatio	Lämpödesorptio	-	-
26.	Lewisiitit	Ilma	-	GC-MS	-	-	-	-
	Biologiset							
27.	Fenyyliarseeniyhdisteet	Kala	Måseskär, Ruotsin rannikko	LC-HESI/MS/MS	H ₂ O ₂	-	HESI	SRM
15.	CWA-yhdisteiden seokset	Sinisimpukat	-	LC-MS/MS	-	In-vitro	APCI/ESI	MRM
28.	CWA-yhdisteiden seokset	Sinisimpukat	Bornholmin syväne	LC-MS/MS	-	-	APCI/ESI	MRM
29.	Fenyyliarseeniyhdisteet	Turskan maksa	-	UHPLC-HRMS	-	-	HESI	HCD

Analyysit ei-biologisista matriiseista

Kiinteäfaasimikrouutto

Puolalaisessa tutkimuksessa¹⁷ tarkoituksena oli kehittää edelleen headspace-kiinteäfaasimikroekstraktiomenetelmää yhdistettynä tandem-massaspektrometriaan. Kromatografisena menetelmänä tässä tutkimuksessa toimi kaasukromatografia. Tutkimus toteutettiin Varsovan merentutkimuksen instituutin ja armeijan teknillisen yliopiston yhteistyönä vuonna 2016. Tutkimus pohjautuu saman tutkimusryhmän vuonna 2014 tekemään tutkimukseen¹⁸ sol-gel-kiinteäfaasimikroekstraktiomenetelmästä, jossa tutkittiin akrylaatti- sekä meta-akrylaattikuitujen sekä näiden kuitujen sekoituksen soveltuvuutta ylipäättään organoarseenipohjaisten kemiallisten aseiden analysoimiseksi porevesinäytteistä. Uusia kuituja vertailtiin jo olemassa oleviin kaupallisiin kuituihin. Huomattiin, että kuituksekoituksessa, jossa on akrylaatti- ja meta-akrylaattikuituja, on parempi hyötysuhde aineiden eristyksessä kuin tavallisilla poolisilla kuiduilla tai polydimetyylisiloksaanipäälysteisillä kuiduilla. Tässä tutkimuksessa löydettiin trifenyylarsiinia kuudesta näytteestä.

Vuoden 2016 tutkimuksessa¹⁷ haluttiin käyttää ja kokeilla uusia SPME-kuituja. Metyyliakrylaatti- (MA) ja metyylimetakrylaattikuidut (MMA) sekä niiden kopolymeerikuitu MA/MMA ovat suunniteltu ja todettu sopiviksi (vuoden 2014 tutkimus)¹⁸ juuri organoarseeniyhdisteiden analyysiin. Tutkimuksessa tutkittiin 85 sedimentti- ja porevesinäytettä. Todettiin CWA-jäämiä löytyneen 25 sedimenttinäytteestä sekä viidestä porevesinäytteestä. Kohdeanalyytit ovat listattuna taulukossa 4. Huomataan, että mukana on myös sinappikaasu sekä sen hajoamistuotteet. Tutkimuksessa testattiin erilaisia SPME-kuituja ja niiden soveltuvuutta tällaiseen analyysiin.

Taulukko 4 Kohdeanalyytit

#	Kohdeanalyytti
1	Sinappikaasu
2	1,4-Ditiaani
3	1,4-Oksatiaani
4	1,4,5-Oksaditiepaani
5	1,2,5-Tritiepaani
6	1,7-Dioksa-4,10-ditiasyklododekaani
7	Difenyylidiklooriarsiini
8	Fenyylidiklooriarsiini
9	Trifenyyliarsiini
10	Klooriasetofenoni
11	Lewisiitti C

Tutkimuksessa Gotlannin ja Gdanskin syvänteestä kerätyistä varsinaisista näytteistä löydettiin muun muassa 1,4-ditiaania, 1,4-oksatiaania ja trifenyyliarsiinia. 21 kappaletta sedimenttinäytteistä sisälsi sinappikaasun hajoamistuotteita ja kahdeksan trifenyyliarsiinia. Porevesinäytteistä vain viidestä löydettiin hajoamistuotteita, neljästä trifenyyliarsiinia ja yhdestä 1,4,5-oxaditiepaania, sinappikaasun hajoamistuotetta. Voidaan siis olettaa, että kemiallisia taisteluaineita on vuotanut mereen ko. upotusalueelta. Tutkimuksessa koitui ongelmaksi se, ettei poolisia CWA-hajoamistuotteita voi analysoida ilman derivatisointia. Taulukossa 5 on porevesinäytteistä saatuja tuloksia.

Taulukko 5 Itämeren upotusalueilta kerätyistä porevesinäytteistä saatuja tuloksia

Näyte	Yhdiste	Konsentraatio (ng/ml)	Upotusalue
Porevesi 1	Trifenyyliaarsiini	3	Bornholmin syväne
Porevesi 2	Trifenyyliaarsiini	42	Bornholmin syväne
Porevesi 3	Trifenyyliaarsiini	112	Bornholmin syväne
Porevesi 4	Trifenyyliaarsiini	12	Gdanskin syväne
Porevesi 5	Trifenyyliaarsiini	202	Gdanskin syväne
Porevesi 6	Trifenyyliaarsiini	57	Gdanskin syväne

Nord Stream, GC-MS ja LC-MS-MS

Nord Stream -kaasuputkihankkeen yhteydessä määritettiin riskit siitä, kuinka kaasuputken rakentaminen mahdollisesti pahentaa sedimenteissä olevien kemiallisten taisteluaineiden ympäristövaikutuksia.¹⁶

Tutkimuksessa analysoitiin 192 sedimenttinäytettä ja 11 porevesinäytettä. Analyyseissä tutkittiin koskemattomia kemiallisia aseita sellaisenaan sekä kemiallisten aseiden hajoamistuotteita. Analyysit tehtiin vuosina 2008 ja 2010. Koskemattomia, sellaisenaan löydettyjä kemiallisia aseita oli näytteissä pieniä määriä, kun taas hajoamistuotteita näytteissä oli enemmän. Näytteitä otettiin 28 analyysialueelta pitkin Nord Stream -kaasuputken reittiä.

Tutkimukset tehtiin VERIFINin laboratoriossa Helsingissä käyttäen GC-MS- ja LC-MS-MS-menetelmiä. GC:ssä käytettiin massaselektiivistä detektoria ja ON-Column-injektiota. LC-MS-MS-menetelmässä käytettiin APCI-ionisaatiota ja spesifistä reaktion monitorointimenetelmää (MRM).

Vuoden 2008 näytteistä aktiivisia CWA-jäämiä löydettiin siten, että kaikista näytteistä adamsiittia oli 3,5 % sekä CLARK I:ä 19,5 % näytteistä. Eniten, 26 % löydettiin fenyyliklooriarseenia (PDA), jota on arseeniöljyssä. Vuoden 2010 analyyseissä analysoitiin 98 näytettä, joista vain kaksi näytettä ylitti määritysrajan (LOQ). Löydettyistä hajoamistuotteista lewisiitti II[ox] on peräisin divinyyliarsiinihaposta, joka taas mahdollisesti peräisin lewisiitti II:den hajoamistuotteesta.

PDCA[SPr] on taas fenyylidiklooriarsiinin hajoamistuote, joka puolestaan saattaa olla peräisin fenyylidiklooriarsiinin hajoamistuotteesta, fenyyliarsonihaposta.

Myös riskiä kaloille arvioitiin, mutta todettiin ettei ko. konsentraatiot ole riski alueen kalapopulaatiolle. Syvemmissä vesissä on vähemmän kalapopulaatioita, joten syvempien vesialueiden osalta riski on pienempi. Kahdelta analyysialueelta voitiin kuitenkin todeta kohonnut mahdollinen riski myös kalapopulaatiolle.

Toisessa saman työryhmän review-artikkelissa ¹⁹ koskien koko viisivuotista Nord Stream -projektia otettiin huomioon myös ryhmän edellinen tutkimus vuodelta 2012, jonka tuloksia käsiteltiin sivulla 21 ¹⁶. Uudessa review-artikkelissa yhdistyvät tutkimukset, joissa yhteensä tutkittiin 391 sedimenttinäytettä viiden vuoden ajalta. Adamsiitin, CLARK I:n, fenyylidiklooriarsiinin, triklooriarsiinin tai lewisiitti II:n jäämiä löydettiin 29 sedimenttinäytteestä. Artikkelikiiteyittää, että CWA-hajoamistuotteita oli vain päällimmäisessä 5 cm:n paksuisessa kerroksessa sedimenttiä, sekä sen, että yleisesti alle 10 %:ssa näytteistä löytyi CWA-jäämiä. Näistä adamsiitin hapettumistuote oli yleisin. Suurin mitattu arvo saatiin fenyylidiklooriarsiinin hajoamistuotteelle kuivapainon arvolla 327 µg/kg dw.

Suurimmat konsentraatiot mitattiin 2011 putken asennuksen yhteydessä ¹⁹, ja voidaan todeta juuri rakennustöitä seuranneen sedimentin ja meren pohjan liikkumisen aiheuttaneen CWA-jäämien nousua sedimentistä esille. Muutoin riski kalapopulaatiolle oli yleisesti Nord Stream kaasuputkihankkeen aiheuttamana todettava merkityksettömäksi. Laskettu riskikerroin oli välillä 0–0,017.¹⁹

GC-MS ja tioliderivatisointi

Bornholmin itäpuolella olevalla upotusalueella tehdyssä tutkimuksessa ²⁰ vuodelta 2010 tutkittiin alueen geofyysisiä ja kemiallisia muutoksia, joista käyn tässä läpi vain artikkelin kemialliset tutkimukset.

Tutkimuksessa analysoitiin vesinäytteitä sekä sedimenttinäytteitä, jotka oli otettu upotusalueelta tai sen välittömästä läheisyydestä. Tutkimuksen kohdekemikaalit olivat adamsiitti, Clark I ja II, sinappikaasu, tabuuni, klooribentseeni sekä arsiiniöljy.

Sedimenttinäytteistä löytyi kemiallisten taisteluaineiden hajoamistuotteita. Useat sedimenttinäytteet sisälsivät juuri arseenipohjaisten kemiallisten aseiden hajoamistuotteita. Yhdestä näytteestä löytyi lisäksi sinappikaasua.

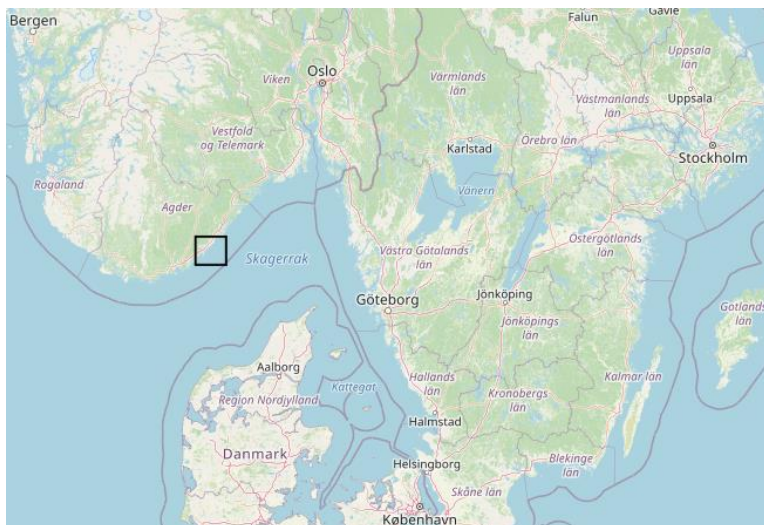
Tämän tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että kemiallisia aseita vuotaa sedimenttiin sekä ympäröivälle alueelle upotuskohdasta. Tutkitut sedimenttinäytteet analysoitiin GC-MS- sekä LC-MS-tekniikoilla. GC-MS-tekniikassa käytettiin analyyttien derivatisointiin propaanitiolia, jotta saataisiin aikaan propaanitioliderivaatit ko. yhdisteistä. LC-MS-analyysissä analyytit hapetettiin vetyperoksidilla hapettumistuotteiden aikaansaamiseksi.

Tutkimuksessa todettiin suuntaa antavasti, että kemiallisia aseita vuotaa ympäristöön upotusalueella sekä myös laajalle alueelle sen ympärillä. Tämä on merkittävä tieto ajatellen upotettuja kemiallisia aseita sekä niiden aiheuttamia riskejä kokonaisuutena.

Skagerrak ja sedimenttianalyysit

Norjalaisessa tutkimuksessa ¹ vuodelta 2006 määritettiin organoarseenipohjaisia kemiallisia taisteluaineita kaivetuista sedimenttinäytteistä Skagerrakista, Arendalin kaupungista kakkoon. Mahdolliset CWA-jäämät olivat peräisin sota-aikana upotettujen sotalaivojen hylyissä olevista asesiiloista. Tutkimuksessa analysoitiin arseenipitoisia kemiallisia aseita 33 eri paikasta kerätyistä sedimenttinäytteistä yhteensä 14 x 4 km kokoiselta alueelta. Tutkimuksessa käytettiin kaasukromatografiaa yhdistettynä massaspektrometriaan. Koska analyysit tehtiin kaasukromatografilla, näytteet derivatisoitiin analyysia varten 1-propaanitiolilla. Suurin osa

löydetyistä organoarseenipohjaisista kemiallisista aseista oli peräisin arsiiniöljyn komponenteista. Suurin konsentraatio löydettiin sedimenttinäytteestä, joka oli lähellä merenpohjassa lojuvaa kemiallisen aseiden pommia. Tässä kyseisessä tutkimuksessa ei löydetty adamsiittia tai lewisiittia. Kuvassa 3 osoitetaan alue, jonne sotalaivat on upotettu.¹



Kuva 3 Sotalaivojen upotusalue

Difenyyliarisiinihapon analyysi saastuneesta maaperästä

Kiinalainen tutkimusryhmä ²¹ on analysoinut upotettujen kemiallisten aseiden takia pilaantuneen maaston sisältämiä difenyyliarisiinihapon (DPAA) sekä fenyyliarisiinihapon (PAA) määriä. Näytteet kerättiin Kiinasta Yujiangin maakunnassa sijaitsevasta Changchungin kaupungista sekä Jiangsun maakunnassa sijaitsevasta Nanjingin kaupungista.

Analyysimenetelmänä käytettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa yhdistettynä tandem-massaspektrometriaan. Tutkimuksessa kehitettiin liuotinerotusmenetelmä, joka validoitiin. Lisäksi testattiin useita erilaisia liuottimia optimaalisen erotuskyvyn saavuttamiseksi sekä matriisivaikutuksen minimoimiseksi. Ideana oli ko. kahden yhdisteen yhtäaikainen analysointi. Dinatriumvetyfosfaattierottelulla päästiin pienimpään matriisiefektiin, ($102\% \leq ME \leq 115\%$).

Tutkimuksessa optimoitiin menetelmä sähkösumutusionisaatiota (ESI) käyttäen sekä ilmanpaineessa tapahtuvalle kemiallisen ionisaatiomenemälle (APCI).

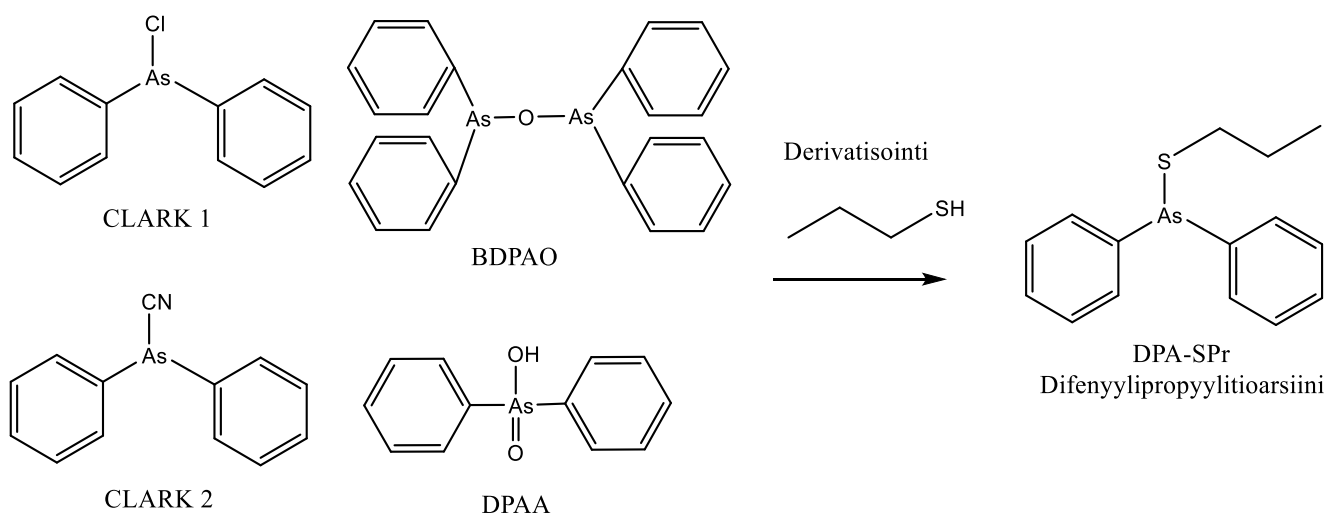
Tutkimuksessa todettiin, että tämä menetelmä on toimiva ja luotettava DPAA:n sekä PAA:n yhtäaikaiseen määrittämiseen maanäytteissä. Tutkimuksessa päästiin recovery-arvoon >74,03 %. Raja-arvo tunnistamiselle oli 0,01 $\mu\text{g kg}^{-1}$ DPAA:lle ja 1,0 PAA $\mu\text{g kg}^{-1}$. Menetelmän määritysrajat olivat PAA:lle 2,52–3,42 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ja 0,23 –0,33 mg kg^{-1} .

Kaivoveden ja maaperän difenyyliarseeniyhdisteet

Vuonna 2005 japanilainen tutkimusryhmä ²² tutki ympäristönäytteiden sisältämiä difenyyliarseeniyhdisteitä, jotka olivat peräisin hylätyistä kemiallisista aseista. Tutkimuksessa kehitettiin ja validoitiin analyttisiä kaas- ja nestekromatografisia menetelmiä. Tutkimuksessa myös käytettiin kehitettyjä menetelmiä erilaisten näytteiden, kuten vesi- ja maaperänäytteiden analyyseihin. Alkuperäiset näytteet oli kerätty Japanissa sijaitsevan Kamisu-chon kaupungin kaivovedestä, jossa oli tiedettävästi väestölle haitallisia DPAA-pitoisuuksia. ²³ Maaperänäytteet kerättiin Samukawa-chon and Hiratsukan kaupungeista Japanista.

Tutkimuksissa tehtiin pysyvyyskokeita CLARK I:lle sekä CLARK II:lle ja huomattiin, että vedessä ne hajosivat bis(difenyyliarsiini)oksidiksi (BDPAO). Stabiilisuuskokeet olivat kestoaltaan 30 päivää.

Kuvassa 4 on havainnollistettu difenyyliarseeniyhdisteiden, CLARK I ja CLARK II, sekä niiden hajoamistuotteiden derivatisointia tiolireagensseilla kaasukromatografista analyysiä varten.



Kuva 4 Difenyyliarseeniyhdisteiden derivatisointi tiolireagensseilla.

Tutkimuksessa onnistuttiin mittaamaan kaivovedestä kvantitatiivisia määriä tioliderivatisoituja yhdisteitä. Maaperänäytteistä päästiin vain 50 % recovery-arvoon johtuen mahdollisesti huonosta erottumisesta. Maaperänäytteistä, jotka oli kerätty vanhalta armeija-alueelta, löydettiin CLARK I:ä, BDPAO:ta sekä trifenyyliarseeni- ja difenyyliarseenitioliderivaatteja. Myös sinappikaasua ja lewisiittiä löydettiin ko. alueelta. Taulukossa 6 on esitetty maaperänäytteistä löytyneitä trifenyyliarsiinipitoisuuksia sekä difenyyliarseeniyhdistepitoisuuksia. Taulukkoon 7 on kerätty vastaavasti kaivovedestä löytyneitä difenyyliarseeniyhdistepitoisuuksia.

Taulukko 6 Hiratsukan kaupungista kerätyistä maanäytteistä löydettyjen yhdisteiden konsentraatioväli ja positiivisten näytteiden määrä.²²

Maaperän syvyys (m)	Trifenyyliarsiini	Pos. näytteitä	Difenyyliarseeniyhdisteet	
	Konsentraatioväli (mg kg ⁻¹)		Konsentraatioväli (mg kg ⁻¹)	Pos. näytteitä
0,5	<0,05	4/26	-	0/26
1,5	<0,05-1,4	6/26	<0,05-0,16	7/26
2,5	<0,05-0,38	4/26	<0,05-0,12	12/26
3,5	0,26	1/26	0,05-0,53	10/26

Taulukko 7 Difenyyliarseeniyhdisteiden saastuneesta kaivovedestä mitattuja pitoisuuksia.²²

Näyte	Konsentraatio (mg l ⁻¹)		
	DPAA	Difenyyliarsee- niderivaatit	Monofenyyliarsee- niderivaatit
Alue A	8,3	6,6	-
Kaivovesi	10	7,4	-
Kaivovesi	6	4,7	1,1
Kaivovesi	7	5,3	0,8
Alue B		0,5	
LOQ	1	0,01	0,5

Toinen japanilainen tutkimus ²⁴ samaisen Kamisun kaupungin kaivoveden difeenyyli- ja fenyliarseenipitoisuuksista tehtiin myös vuonna 2005. Tutkimuksessa analyysimenetelmänä oli korkean erotuskyvyn nestekromatografia yhdistettynä induktiivisesti kytkettyyn plasma-analysaattoriin (ICP) ja massaspektrometriin. Nestekromatografissa käytettiin sähkösumutusionisaatiota ja massaspektrometrinä toimi time-of-flight-massa-analysaattori. (ESI-TOF).

Näytteet kerättiin kuudesta eri kaivosta noin 5–6 metrin syvyydestä. Tutkimuksessa löydettiin arсениittia, PAA:ta, PAO:ta (fenyyliarsiinioksidi) sekä DPAA:ta. Menetelmän toteamisrajat näytteille olivat arсениitille 4 pg, PAA:lle 2,5 pg, PAO:lle 2,5 pg ja DPAA:lle 2,8 pg. Taulukosta 8 nähdään kaivojen vesistä analysoidut yhdisteet ja niiden pitoisuudet.

Taulukko 8 Arseeniyhdisteiden kaivovedestä mitattuja konsentraatioita.²⁴

Kaivo	Arseniitti (ng cm ⁻³)	PAA (ng cm ⁻³)	PAO (ng cm ⁻³)	DPAA (ng cm ⁻³)
1		3549		7980
2		1388		
3				
4	5782			
5		654		
6				163

Upotusalueen screening-sedimenttianalyysi

Niemikoski et al. ⁶ analysoivat sedimenttinäytteistä fenyyliarseenipitoisia kemikaaleja. Tavoitteena oli sedimenttinäytteiden ultrakorkeapaine-nestekromatografinen analyysi yhdistettynä korkearesoluutio-massaspektrometriaan (UPHLC-HRMS). Tutkimus ei ollut kohdistettu erityisesti mihinkään tiettyyn yhdisteeseen vaan oli ns.seulontatutkimus. Tutkimuksessa etsittiin kuitenkin kaikkia fenyyliarseenipitoisia yhdisteitä, koska useat arseenipitoiset taisteluaineet sisältävät juuri fenyyliarseenirungon.

Analyysit tehtiin käyttäen Orbitrap-massaspektrometriä, joka mahdollistaa tarkemman rakenneanalyttisen informaation saamisen tuntemattomista analyyteistä esimerkiksi lentoaika-analysaattoriin verrattuna (TOF).

Tutkimuksessa löydettiin täysin uusia fenyyliarseeniyhdisteitä, jotka olivat muodostuneet trifenyyliarseenista, adamsiitista, CLARK I:tä sekä fenyylidiklooriarsiinista. Ei ole täysin varmaa, millaisten reaktioiden kautta uudet yhdisteet ovat merenpohjassa muodostuneet. Mikrobiologiset reaktiot ovat mahdollisia esimerkiksi löydettyjen metyloitujen yhdisteiden tapauksessa. Tämä myös tarkoittaa, että uusia tuntemattomia fenyyliarseeniyhdisteitä saattaa olla enemmänkin merenpohjassa, mikä lisää huolta niiden mahdollisista negatiivisista vaikutuksista ekosysteemille.

Lewisiittien analyysit

Kaasukromatografista lewisiittien sekä niiden hydrolyysituotteiden analyysia on tehty vuoden 2013 hollantilaisessa tutkimuksessa ²⁵, jossa analysoitiin mm. nestemäisiä näytteitä sekä kiinteitä mutta kosteita näytteitä. Tutkimuksessa kehitettiin nopeaa ja toimivaa menetelmää lewisiittien analysoimiseksi kaasukromatografisesti.

Näytteiden derivatisoinnissa käytettiin butyylioliolaatiota trimetyylisilylaation sijasta, mikä tässä todettiin järkeväksi ratkaisuksi. Derivatisaatioreaktio tehtiin sorbenttimateriaalia sisältävän putken sisällä. Kaasukromatografisessa menetelmässä hyödynnettiin lämpödesorptiota.

LOD oli tutkimuksessa $100 \leq \text{ng/ml}$. Huomattava etu kehitetyssä menetelmässä oli sen nopeus: Näytteen esikäsittely vei vain yhdeksän minuuttia. Näytetilavuus oli 10 μl .

Kyseessä olevaa menetelmää käytettiin onnistuneesti vanhan OPCW:n pätevyystestin näytteen analysoimiseksi.

Sama tutkimusryhmä on analysoinut lewisiittejä myös ilmanäytteistä ²⁶. Tutkimusryhmä kehitti liikkuvaan laboratorioon sopivaa ja halpaa menetelmää. Toimivaksi osoittautui TENAX TA - materiaalia sisältävä näytteenottoputki, joka voidaan yhdistää suoraan kaasukromatografiin analyysin suorittamiseksi. Tällä menetelmällä päästiin 0,8–0,9 nanogramman toteamisrajaan. Menetelmää evaluoitiin myös OPCW:n toimesta.

Biologiset matriisit

Hanna Niemikosken ²⁷ vuodelta 2017 julkaistussa artikkelissa tutkittiin arseenia sisältävien kemiallisten aseiden vaikutusta mereneläviin, tässä tapauksessa kaloista ja hummereista otettuihin näytteisiin. Tutkimuksen näytteet oli kerätty Måseskärin upotusalueelta Ruotsin rannikolta.

Tutkimuksessa tutkittiin LC-HESI/MS/MS-tekniikalla adamsiitin, Clark I:n sekä trifeenyliarsiinin hapettuneita muotoja: DM[ox], DPA[ox] sekä TPA[ox]. Tutkimuksessa kehitettiin ja validoitiin menetelmä 1–5, 0,2–5, ja 0,2–5 ng/g -asteikolla koskien mainittujen kemikaalien hapettuneita muotoja. Menetelmä validoitiin turskan lihaskudosmatriisille.

Tutkimuksessa havaittiin kolmessa näytteessä pieniä LOQ-rajan alittavia pitoisuuksia. Tutkimuksen LOQ-rajat olivat 2,0 ng/g DM[ox]:lle, 1,3 ng/g DPA[ox]:lle sekä 2,1 TPA[ox]:lle.

Kyseinen tutkimus oli ensimmäinen, jossa suoraan tutkittiin mahdollisia taisteluaineiden jäämiä merenelävissä. Tutkimuksessa saatiin osviittaa siitä, että ainakin joitain pitoisuuksia vuotavista kemiallisista aseista päätyy mereneläviin.

Höher et al. ¹⁵ tutkivat toksisuuden ilmentymistä *Mytilus trossulus* -simpukoissa. Tutkimus tehtiin täysin laboratorio-olosuhteissa, ja tarkoitus oli simuloida oikeaa upotusaluetta. Tutkimuksessa

analysoitiin simpukoiden lihaskudoksesta mm. adamsiitin ja Clark-yhdisteiden sekä mahdollisten hapettuneiden muotojen pitoisuuksia. Tekniikkana käytettiin ulossuolausta asetonitriliin. Analysointi tapahtui LC-MS/MS-menetelmällä kolmoiskvadrupoli-massaspektrometrillä. Isonisaatiotekniikkana oli APCI. Tekniikalla onnistuttiin löytämään altistettujen simpukoiden lihaskudoksesta bioakkumuloituneita kemikaaleja. Tämä viittaa siihen, että menetelmää voi käyttää oikeiden upotusalueelta kerättyjen simpukoiden tapauksessa, mitä kokeiltiin toisessa tutkimuksessa ²⁸.

Upotusalueelle sijoitettujen simpukoiden annettiin altistua 2,5 kuukautta 35 sekä 65 metrin syvyyksissä, minkä jälkeen niistä mitattiin jäämiä kemiallisista taisteluaaineista. Analysoitavat lihaskudosnäytteet valmistettiin kuten aikaisemmassa tutkimuksessa ¹⁵. Tutkimuksessa käytettiin LC-MS/MS-menetelmää ja kolmoiskvadrupoli-massaspektrometriä. Upotusalueen simpukoista ei tässä tutkimuksessa kuitenkaan löydetty kemiallisten aineiden hajoamistuotteita. Tutkimuksessa kuitenkin löydettiin muutoksia bio- ja histokemiallisissa biomarkkereissa, joita käsittelemme tarkemmin kappaleessa 5.2.

Fenyyliarseenipitoisten taisteluaineiden aiheuttamia muutoksia turskan maksasoluissa käsittelevän tutkimuksen ²⁹ yhteydessä analysoitiin mahdollisia maksassa muodostuneita hydroksyloituneita ja metyloituneita taisteluaineiden metaboliitteja. Analyysimenetelmänä käytettiin UHPLC-HRMS-menetelmää, käyttäen Orbitrap Fusion -massaspektrometria. Isonisaatiotekniikkana oli kuumassa lämpötilassa tapahtuva sähkösumutus-ionisaatio (HESI). Käsittelemme tutkimuksen metaboliaosuutta kappaleessa 5.2.

4.1. Yhteenvetoa artikkeleista

Analyysimenetelmissä näkyvät kaas- ja nestekromatografiset menetelmät yhdistettynä massaspektrometriaan. Kaasukromatografisissa menetelmissä on jouduttu derivatisoimaan yhdisteitä mm. 1-propaanitiolilla ennen analyysiä. Osassa tutkimuksista on kehitetty menetelmää ja validoitu se. Osassa on myös käytetty ko. tutkimuksessa kehitettyä menetelmää varsinaisten näytteiden analysoimiseksi. Korkeapainenestekromatografiaa on käytetty osassa analyysejä, ionisaatiotekniikoina on käytetty sähkösumutusionisaatiota (ESI) sekä normaali-ilmanpaineessa tapahtuvaa kemiallista ionisaatiotekniikkaa (APCI). Menetelmänä on käytetty myös induktiivisesti yhdistettyä plasmaa yhdistettynä massaspektrometriaan.

Näytematriisit ovat olleet vaihtelevia: maaperän analyysejä, porevesianalyysejä, sedimenttianalyysejä sekä biologisen materiaalin analyysejä. Näytteitä on otettu ja analysoitu mm. kaivovedestä sekä maaperästä armeija-alueella Japanissa. Näytteitä on analysoitu kaloista, hummereista, kalan sapesta ja *Mytilus Trossulus* -suvun simpukoista. Sedimentti- ja porevesinäytteitä on tehty esimerkiksi Itämeren alueelta Nord Stream -kaasuputkihankkeen yhteydessä.

Näytteenkäsittelyssä on hyödynnetty esimerkiksi liuotinerottelua, ja myös kiinteäfaasimikroekstraktiota (SPME) on käytetty ja erilaisten kuitujen soveltuvuutta testattu. Lisäksi analyysejä on tehty kaasukromatografisesti analysoiden ilmanäytteitä.

5. Upotettujen taisteluaineiden ympäristövaikutukset

Kemialliset aseet ovat vaarallisia sodankäynnin välineitä ihmisille. Ei voida siten täysin olettaa, että kemialliset aseet upotettuina merenpohjaankaan olisivat vaarattomia. Upotetut kemialliset aseet aiheuttavat riskin ympäristölle ja siinä eläville eliöille, kaloille sekä mahdollisesti myös kalastajille ja kalaa ravinnoksi syöville ihmisille. Merenpohjan hyödyntäminen käyttöön esimerkiksi merellä sijaitsevien tuulivoimaloiden, merikaapeleiden tai öljyputkien rakentamiseksi lisää mahdollista riskiä altistua kemiallisille aseille. Sitä, miten suuri mahdollinen riski on, ei vielä täysin tyhjentävästi tiedetä. Tutkimuksia on kuitenkin tehty ja tehdään edelleen.

Tässä kappaleessa syvennyttään erilaisiin mahdollisiin riskeihin ja ympäristövaikutuksiin, joita upotetuilla kemiallisilla aseilla on tai saattaa olla. Vertaillaan arseenin toksisuutta vapaan arseenin, sen erilaisten spesiesten ja arseeniyhdisteiden välillä. Koska keskitytään pääasiassa arseenipitoisiin taisteluaineisiin, selvennetään taisteluaineiden vaarallisuutta sekä toksisuutta ja niiden hajoamistuotteen DPAA:n toksisuutta. Esitellään tutkimuksia, joissa arseeniyhdisteiden toksisuutta ja sen ilmentymistä eliöissä on tutkittu. Selvennetään lyhyesti toksisuuden biomarkkereita ja mahdollisia bioakkumulaatioon liittyviä seikkoja esimerkiksi geno- neuro- sekä sytotoksisia riskejä. Lisäksi selvennetään sitä millaisen riskin upotetut aseet aiheuttavat sedimentissä. Lopuksi pohditaan ihmisille aiheutuvaa riskiä.

Pro gradu -tutkielman kokeellisen osion aiheena on menetelmän kehitys difenyyliarsiinihapon glutathionikonjugaatin määrittämiseksi turskan sapesta; siksi omistan tässä kappaleessa oman osion glutathionille ja arseeniyhdisteiden glutathionimetabolialle.

5.1. Yhdisteiden toksisuus

Arseeni on myrkyllinen raskasmetalli. Myös sen oksidit ja muut yhdisteet ovat kaikki myrkyllisiä. Arseenin ja sen yhdisteiden myrkyllisyys perustuu arseenin ominaisuuteen salvata soluhengitys.

30

Orgaaninen vs. epäorgaaninen

Krooninen altistuminen epäorgaaniselle arseenille on vahvasti yhteydessä lisääntyneisiin keuhko-, virtsarakko- sekä ihosyöpätapauksiin. Myös lisääntynyt riski diabetekseen sairastumiselle tai kehityshäiriöiden syntymiselle on olemassa. Myös fenyyliarseeniyhdisteet, CLARK I, CLARK II sekä adamsiitti, ovat synteettisiä yhdisteitä, ja niitä pidetään arseenia sisältävinä molekyyleinä yleisesti haitallisina, vaikka tutkimus ei ole vielä täysin selvillä kaikista fenyyliarseeniyhdisteiden mahdollisista haittavaikutuksista ihmiskehossa.³¹

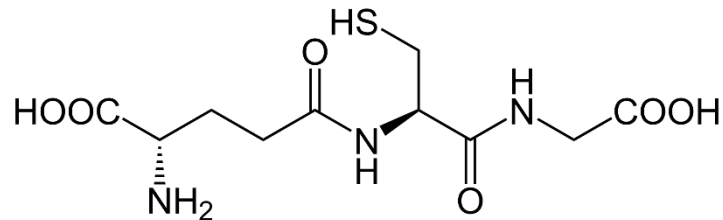
Arseenin toksisuus kuitenkin vaihtelee sen mukaan, onko arseeni orgaanisessa vai epäorgaanisessa muodossa. Arseenin metabolia kehossa riippuu siitä, millaisessa muodossa arseeni on. Orgaanista arseenia ei pidetä niin vaarallisena kuin epäorgaanista arseenia. Esimerkiksi ravinnosta kaloja ja muita mereneläviä syömällä saatava arsenobetaiini on vähemmän haitallista, eikä se reagoi kehossa juuri ollenkaan ja poistuu virtsan mukana sellaisenaan elimistöstä.³²

Penta- ja trivalenttiset arseeniyhdisteet

Pentavalenttiset arseeniyhdisteet ovat kehossa yleensä vapaina ioneina, kun taas trivalenttiset, kuten ko. kemialliset taisteluaaineet, ovat konjugoituneina glutationin tioliryhmään.³³

Trivalenttisen arseenin sitoutuminen glutationiin on perusteena sille, miksi pro gradu -tutkielmani tutkimuskohteena oli kalan sappeen erittyvä difenyyliarseenin glutationikonjugaatti. Glutationi vaikuttaa juuri toksisten arseenimetaboliittien syntymiseen, ja sen määrä kehossa on myös tekijänä yhdisteiden toksisuudessa.³⁴ Glutationin sitoutumista arseeniin on tutkinut mm. yhdysvaltalainen tutkimusryhmä vuonna 2009. Tutkimuksessa eriteltiin erilaisten arseeniyhdistemetaboliittien toksisuutta ja käyttäytymistä. Tutkimuksessa selvennettiin

esimerkiksi juuri arseeni-glutationikompleksien nopeaa hajoamista biologisissa näytteissä.³⁵ Glutathioni sitoutuu pelkistyneessä muodossa trivalenttiseen arseeniatomiin As-S-sidoksella. Glutathionin rakennekaava on esitettyä kuvassa 5.



Kuva 5 Glutathioni

Arseenipitoisten taisteluaineiden toksisuus


Arseenipitoiset kemialliset taisteluaineet aiheuttavat pääasiassa voimakasta ärsytystä hengitysteissä ja aivastuskohtauksia. Tämän seurauksena taistelukentällä oli se, että sotilaan olisi riisuttava käyttämänsä kaasunaamari. Tämä puolestaan altisti sotilaan muille kemiallisille aineille, esimerkiksi fosgeenille⁴.

CLARK II on voimakkaammin ärsyttävä aine kuin sen edeltäjä CLARK I. Vain 0,25 µg/ litrassa hengitysilmaa hengitettynä minuutin ajan on käyttäjälleen sietämätöntä. Adamsiitin mediaani LC₅₀-arvo on 11 grammaa min/m³⁴.

Lewisiitti

Ensimmäisen maailmansodan jälkeen Yhdysvaltojen sotavoimien kemistit⁴ luokittelivat arseenipitoisten ja rakkuloita aiheuttavien taisteluaineiden toksisuuksia, joita olen koonnut taulukkoon 9.

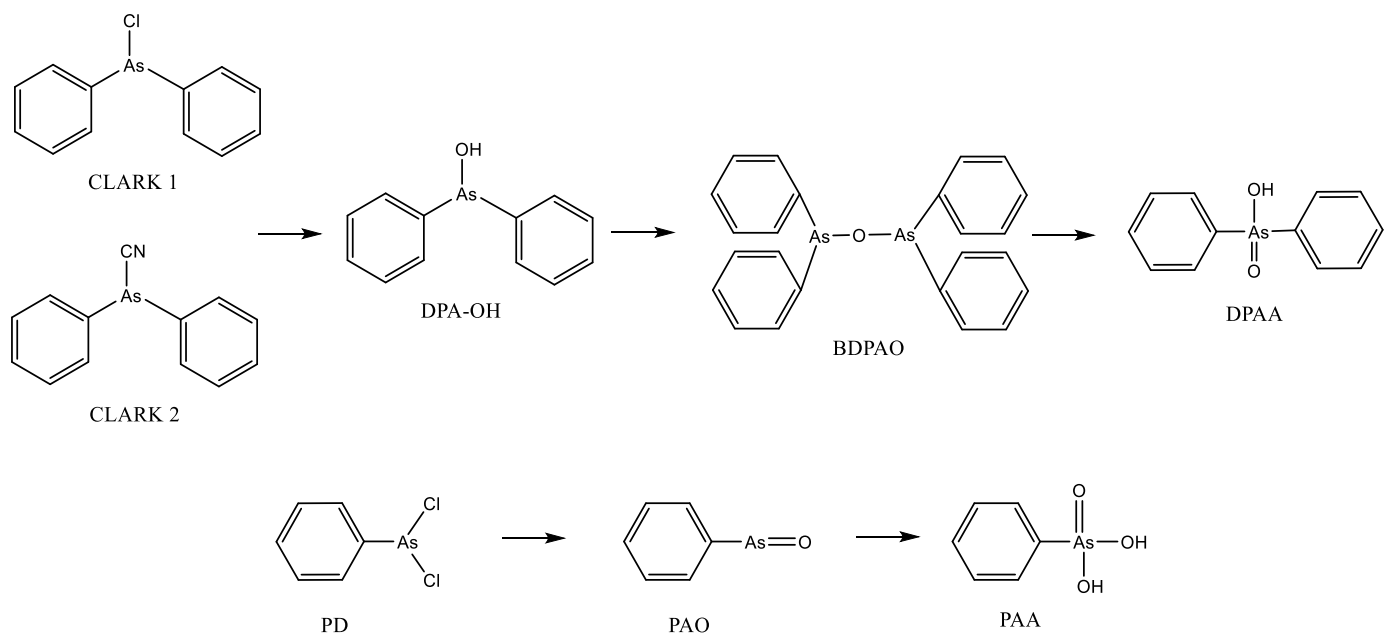
Taulukko 9 Taisteluaineiden toksisuuksia

Aine	Toksisuus kasvaa
Lewisiitti	
Sinappikaasu	
Fenyylidibromiarsiini	
Etyyylidiklooriarsiini	
Etyylidiklooriarsiini	
Metyylidiklooriarsiini	
Dibromimetyylisulfidi	

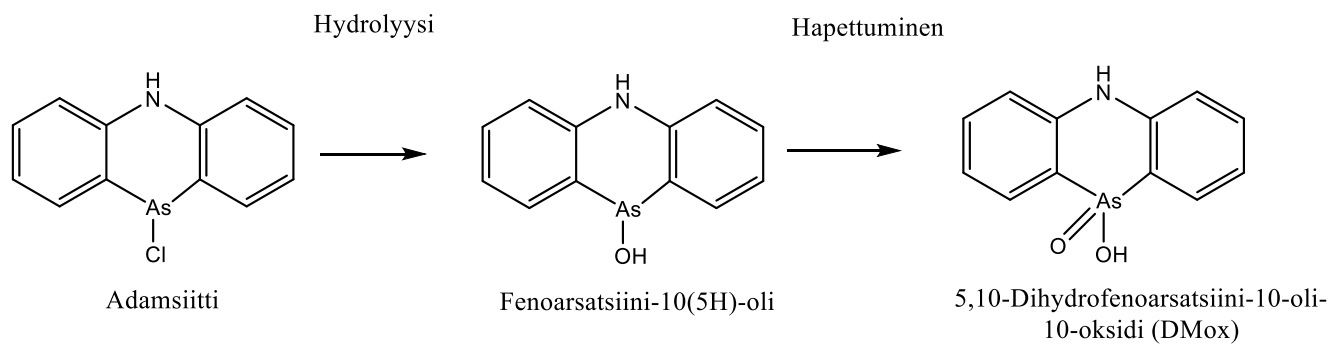
Taulukosta huomataan lewisiitin saavan korkean toksisuuden arvon. Lewisiitti hydrolysoituu vedessä nopeammin kuin sinappikaasu ja lewisiitin hajoamistuotteet ovat toksisempia kuin sinappikaasun. Lewisiitti myös nestemäisessä muodossa lävistää ihon 3–4 kertaa nopeammin kuin sinappikaasu. Lewisiitti aiheuttaa suurta kipua ja ihon punoitusta minuuteissa altistuksesta. ⁴

Hajoamistuotteet

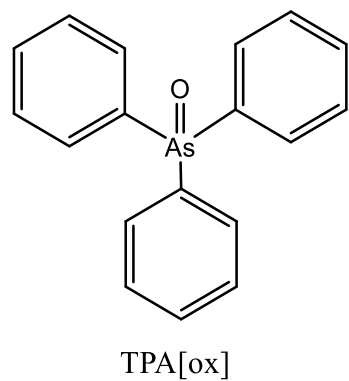
Upotettujen arseenipitoisten taisteluaineiden hajoamistuotteet ovat myös toksisia. Difenyyliarsiinihapon DPAA ja fenyyliarsonihapon (PAA) muodostuminen on esitettyä kuvassa 6. Huomataan, että molemmat CLARK I sekä CLARK II hydrolysoituvat DPAA:ksi. Fenyylidiklooriarsiini PD sen sijaan hydrolysoituu PAA:ksi. Adamsiitti taas hapettuu kuvan 7 mukaisesti ensin hydrolysoitumalla ja sitten hapettumalla. Tämä on hidas prosessi. Kuvassa 8 on esitettyä vastaavasti trifenyyliarsiinin lopullinen hajoamistuote.



Kuva 6 DPAA:n sekä PAA:n muodostuminen



Kuva 7 Adamsiitin hapettumistuote



Kuva 8 TPA:n hapettumistuote

5.2. Toksisuuden ilmentyminen eliöissä

Toksisuuden ilmentymistä eliöissä on tutkittu kahdessa tutkimuksessa.^{15 28} Tutkimuksissa käytettiin tutkimuskohteena simpukoita arvioitaessa kemiallisten taisteluaineiden toksisuutta ja tutkittaessa mahdollisia biomarkkereita, jotka indikoisivat altistusta.

Arseeniyhdisteiden toksisuutta, terveysvaikutuksia sekä bioakkumulaatiota testattiin laboratorio-olosuhteissa. Tutkimuksessa¹⁵ osoitettiin, että arseenia sisältävillä yhdisteillä Clark I, adamsiitilla sekä myös klooriasetofenonilla on toksisia vaikutuksia *Mytilus*-suvun simpukoihin. Tutkimuksessa simuloitiin olosuhteita, jollaisille simpukat voisivat todellisuudessa altistua; erilaisille määriille kemiallisia taisteluaineita vaihtelevin konsentraatioin eli toisin sanoen sekoitukselle erilaisia kemiallisia aineita. Tutkimuksessa keskityttiin fenyyliarseeniyhdisteisiin sekä klooriasetofenoniin.

Tutkimuksessa tarkasteltiin laboratorio-olosuhteissa erilaisia toksisuutta ilmaisevia biomarkkereita simpukoissa. Biomarkkereissa haluttiin tutkia geno- ja sytotoksisia merkkejä, kuten muutoksia entsyymikinetiikassa sekä immunologisissa vasteissa. Tutkimuksessa esimerkiksi tarkasteltiin ympäröivän veden ja vedessä altistuneen simpukan lihaskudoksen arseeniyhdisteiden konsentraatioita, joita mitattiin analyttisesti.

Kysessä oli ensimmäinen tutkimus, jossa osoitettiin arseenia sisältävien kemiallisten taisteluaineiden hapetustuotteiden bioakkumulaatiota merieliöiden kudoksiin. Bioakkumulaatiota tapahtui pääasiassa hapettuneen Clark I:n ja adamsiitin tapauksessa sekä jossain määrin myös klooriasetofenonin kohdalla. Tutkimuksissa huomattiin myös akuutteja syto- ja immunotoksisia vaikutuksia eliöissä, kun ne altistettiin kemikaaleille. Akuutteja vaikutuksia huomattiin esimerkiksi solutasolla ja simpukoiden liikkeissä. Huomattavaa on, että akuutit vaikutukset tulivat esille jo pienillä konsentraatioilla.

Difenyylarsiinihapon ja sen yhdessä glutathionin kanssa muodostuneista yhdisteistä on mitattu syto- ja genotoksisia vaikutuksia nisäkässoluissa.³⁶ Esimerkiksi ihmisen HepG2-soluissa mitattiin DPA-SG:n olevan in vitro -tutkimuksessa tuhatkertaisesti toksisempi kuin pelkkä hapettunut difenyylarsiinihappo.^{34 37}

Tutkimus upotusalueella

Hiljattain 2020 julkaistussa tutkimuksessa ²⁸ tutkittiin myös *Mytilus trossulus* -suvun sinisimpukoita. Tutkimus oli varsinaisella upotusalueella tehty altistuskoe, jossa simpukat altistettiin viemällä ne häkeissä 35 sekä 65 metrin syvyyksiin, joissa niiden annettiin olla 2,5 kuukautta. Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia mahdollista kemikaalien bioakkumulaatiota sekä muita biologisia vaikutuksia. Tutkimuksessa simpukoissa ei havaittu fenyyliarseenipohjaisten kemiallisten aseiden hajoamistuotteita, mutta havaittiin sen sijaan erilaisia biomarkkereita, jotka viittaavat altistukseen.

Altistukseen viittasivat huomattavat vasteet geno- ja sytotoksisuuden indikaattoreissa, bioenergeettisissä parametreissa sekä histokemiallisissa biomarkkereissa. Kun simpukoista mitattua biomarkkereiden integroitua biomarkkeri-indeksiä verrattiin vertailualueen ja altistusalueen välillä, sen huomattiin olevan huomattavasti suurempi altistusalueella.

Simpukoiden todettiin kärsivän ympäristötekijöiden aiheuttamasta stressistä, joka on vaikuttanut negatiivisesti simpukoiden hyvinvointiin. Tämän voidaan katsoa linkittyvän kemialliseen stressiin sekä mahdollisesti juuri upotettujen kemiallisten aseiden altistuksesta aiheutuneeseen kemialliseen kuormaan.

5.3. Mahdolliset vaikutukset ympäristölle

Sandersonin työryhmän artikkelissa vuodelta 2010 ³⁸ todettiin, että jotta upotettujen kemiallisten taisteluaineiden riskejä voitaisiin kunnolla arvioida, tarvittaisiin parannuksia neljällä eri osa-alueella. Näitä ovat analyttisten menetelmien kehittyminen, ajan tasalla oleva ekotoksikologinen ja fysikokemikallinen data sekä parempi tietämys juuri kyseessä olevasta upotusalueesta ja alueen kemikaalisiilojen kunnosta. Lisäksi tarvittaisiin parempia ekotoksikologisia indikaattoreita. Toisin sanoen riskit ovat olemassa ja lisää tutkimusta tarvitaan. Adamsiitin ja Clark I:n on katsottu aiheuttavan suurinta huolta upotetuista yhdisteistä. Sinappikaasu ja organofosforiyhdisteet ovat seuraavassa kategoriassa arvioitaessa yhdisteiden riskejä. ³⁹ Monessa tutkimuksessa, joita

käsittelen tässä tutkielmassa, on selvennetty, että upotetut kemialliset aseet vuotavat ympäristöön ja sedimenttiin.

Vuonna 2020 Itämereen upotettujen kemiallisten aseiden riskejä ja niille altistumista arvioitiin uudelleen.⁴⁰ Tutkimuksessa kiteytettiin, että varsinkin adamsiitti, Clark I, Clark II sekä sinappikaasu vapautuvat vuotavista siiloista ympäristöön. Lisäksi yhdisteet muuntuvat ja hajoavat ympäristössä kemikaaleiksi, joista osa on myrkyllisiä. Kemikaalit aiheuttavat ongelmia jopa 250 metrin säteellä upotetusta kemiallisesta asesiilosta. Tutkimuksessa todettiin myös, että Bornholmin alue on upotusalueista saastunein.

Kymmenen vuoden aikana on saatu lisää tutkimustietoa alueen riskeistä, ja tutkimukset jatkuvat edelleen.

5.4. Eliöt

Metabolia

Fenyyliarseeniyhdisteiden metaboliaa turskan maksassa on tutkittu vuonna 2020 julkaistussa tutkimuksessa. Tutkimus tehtiin in vitro.²⁹ Tutkimus keskittyi turskan maksassa tapahtuvaan fenyyliarseeniyhdisteiden metaboliaan. Tutkittavat kemikaalit olivat adamsiitti ja Clark I sekä niiden hapettuneet muodot. Lisäksi tutkittiin trifenyyliarsiinin sekä fenyyliarsonihapon hapettuneita muotoja.

Syntyneet adamsiitin, Clark I:n ja fenyyliarsonihapon glutationikonjugaatit olivat vallitsevia metaboliitteja. Lisäksi havaittiin yhdisteiden metyloituneita sekä hydroksyloituneita metaboliitteja, mikä saattaa kertoa maksan entsyymaattisen toiminnan seurauksena tapahtuvista metaboliareaktioista. Glutationikojugaattia ei kuitenkaan muodostunut trifenyyliarsiinin tapauksessa. Tämä voi johtua erilaisista biokemiallisista reaktioista, joita yhdiste käy läpi metaboloituessaan.

Tutkimuksessa todettiin, että syntyneitä metyloituneita tai hydroksyloituneita metaboliitteja voisi mahdollisesti mitata analyttisesti arvioitaessa kalapopulaation altistusta arseenia sisältäville kemiallisille aseille.

Genotoksisuus

Geno- ja sytotoksisuutta mitattiin turskan, kampelan ja sillin kohdalla eteläisen Itämeren alueella lähellä kemikaalien upotusaluetta. Tutkimuksessa ⁴¹ todettiin merkkejä erilaisissa syto- ja genotoksisuutta ilmentävissä mittareissa, kun vertailtiin referenssi- ja upotusalueen kaloja. Varsinkin suuri riski kaloille aiheutuvalle genotoksisuudelle oli mitattavissa. Bornholmin upotusalueella kaloille aiheutuva sytotoksisuus ja genotoksisuus oli mitattaen suurinta. ^{42 41} Arseenin bioakkumulaatio ravintoketjussa ja sen aiheuttama toksisuus kaloille voi toimia hyvänä indikaattorina koko vesistön saastuneisuutta arvioitaessa ⁴³.

5.5. Riski ihmisille

Vaikka esimerkiksi kaloista löydetty jäämät kemiallisista taisteluaaineista ovat hyvin pieniä, tasolla ng/g, on silti kyseenalaista, jos kemiallisille taisteluaineille altistuneita kaloja päätyy ihmisten ruokapöytiin.

Hans Sandersonin tutkimuksessa arvioitiin kemiallisilla aseilla saastuneen kalan syömistä Itämeren alueella. ⁴⁴. Suurimmat ongelmat liittyvät upotettuun trifenyylarsiiniin sekä sinappikaasuun. Tutkimuksen tarkoituksen oli arvioida epäsuoraa altistumista ihmisillä, koska kalapopulaatio esimerkiksi Bornholmin alueella on suurentuneessa vaarassa altistua kemiallisille aseille.

Myös Välimeren alueella sijaitsevan upotusalueen ympäristön kaloissa on huomattu kalojen ihossa rakkuloita, jotka viittaavat altistukseen. Tutkimuksen mukaan kaloista mitatun arseenin pitoisuus on suurempaa ko. alueella.

Karkea arvio oli, että esimerkiksi vain 0–1 kala-ateriaa kuukaudessa olisi turvallinen määrä mahdollisen syövän syntymisen kannalta, jos ajatellaan orgaanisen arseenin määrää kaloissa. Tutkimus kuitenkin painottaa, että aihetta olisi syytä tutkia lisää.

Difenyyliaarsiinihapon syto- ja genotoksisuutta ihmissoluissa arvioitiin japanilaisessa tutkimuksessa vuodelta 2004 ³⁶. Tutkimus tehtiin in vitro. DPAA:lla oli toksisia vaikutuksia ihmisen maksasta kerätyissä syöpäsoluissa. Tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että pienempi glutationin määrä solussa vähensi DPAA:n sekä dimetyyliarsiinihapon DMA:n toksisuutta. Kuitenkin arseeniitin toksisuus lisääntyi glutationikonsentraation pienentyessä. Glutationilla on siis tärkeä rooli arseeniyhdisteiden metaboliassa ja toksisuudessa. ³⁶

Kaivovesi

Japanissa kaivovesiin sekä maaperään on päätynyt DPAA:ta Japanin toisen maailmansodan aikaisen kemiallisten aseiden upottamisen seurauksena. DPAA:n vaikutuksia ihmisiin on siten päästy tutkimaan.

Ishii et al. ²³ tutkivat saastuneen kaivoveden vaikutusta ihmisiin. DPAA:lla saastunutta kaivovettä juomavetenään käyttävillä ihmisillä oli todettu aivoperäisiä oireita sisältävää syndroomaa sekä hermosto- ja neurologisia oireita. DPAA:ta löytyi asukkaiden kaivovedestä 4,5 mg/l konsentraatitasolla. Potilailla havaittiin ongelmia puheen tuottamisessa, normaalissa liikkumisessa ja astumisessa sekä mm. polkupyörällä ajossa. Lisäksi havaittiin vapinaa, käsien ja jalkojen heikkoutta sekä yleistä huonovointisuutta. Oireistoon kuului myös unettomuutta, näkökyvyn heikkenemistä sekä muistiongelmia. DPAA:n vaikutus rajoittuu kuitenkin lähinnä keskushermostoon. Arseenimyrkytykselle tyypillisiä iho-oireita ei kuitenkaan havaittu potilailla. Potilaiden virtsasta mitattiin DPAA:ta konsentraatitasolla 0,02 mg/l. Potilaiden olo koheni, kun altistus saastuneelle kaivovedelle loppui.

Toisessa tutkimuksessa ⁴⁵ tutkittiin organoarseeniyhdisteiden myrkyllisyyttä ja myrkytyksen aiheuttamia mahdollisia pysyviä haittoja. Tässäkin tutkimuksessa todettiin DPAA:n saastuttaman kaivoveden aiheuttavan keskushermosto-oireita. Kyseiset oireet kuitenkin paranivat, tosin vasta

vuosien jälkeen altistuksesta. Tutkimuksessa käytettiin ja tutkittiin silmien epätavallisia liikkeitä indikaationa DPAA:lle altistumiselle. Silmien nykivät liikkeet olivat tyypillisiä 79 %:lle altistuneista. Tutkimuksessa päädyttiin siihen, että silmien epätavallisia liikkeitä voitaisiin käyttää indikaationa DPAA:lle altistumiselle. DPAA:n vaikutus rajoittuu lähinnä keskushermostoon, mikä selittää myös saastuneelle kaivovedelle altistuneiden potilaiden oireet. Neurologisia oireita tukee DPAA:n mahdollinen vaikutus glutaminaasi C -entsyymin toimintaan, mikä on tärkeää tekijä glutamiinihapon muodostumiselle keskushermostossa. ⁴⁶

DPAA:n on todettu aiheuttavan kokeissa myös hiirillä samankaltaisia oireita kuin saastuneelle kaivovedelle altistuneille ihmisille ⁴⁷.

Bakteerit

DPAA:n vaikutuksia on tutkittu myös arkkibakteereissa, ja todettiin ettei DPAA:lla ole suurta vaikutusta arkkibakteeriyhteisöihin. Myöskään *Clostridium*- ja *Methanosarcina*-sukujen bakteerien kasvu ei häiriintynyt DPAA:lla saastuneessa, anaerobisessa maaperässä. ⁴⁸

Mahdollinen karsinogeenisuus rotilla

Difenyyliaarsiinihapon karsinogeenisyyttä tutkittiin kahdessa altistuskokeessa, joissa F344-rottia altistettiin DPAA:lle juomaveden kautta 52 sekä 104 viikon ajan. ^{49 50}

52 viikon altistustutkimuksessa todettiin, että DPAA edisti maksan karsinogeneesiä aryyliliilivetyreseptorien välityksellä ja siitä seuraavaan oksidatiivisiin DNA-vaurioiden induktioon. DPAA:n raportoitiin olevan myrkyllistä intra- ja ekstrahepaattisten sappiteiden epiteelille. DPAA edisti karsinogeneesiä maksasoluissa, muttei tutkimuksen rottien muissa elimissä.

Myöhemmin tehdyssä 104 viikon altistustutkimuksessa päädyttiin kuitenkin lopputulokseen, että DPAA ei ollut täysin karsinogeeninen F344-rotilla. Tutkimuksessa ei huomattu merkittävää lisäystä tuumorien määrässä missään kudoksessa tai elimessä. Tutkimuksessa altistettiin F344-

rottia DPAA:lle konsentraatiotasolla 5, 10 ja 20 ppm. Sillä todettiin olevan kasvaiminen kasvua kiihdyttäviä ominaisuuksia mutta ei uusien kasvaimen kasvua aikaansaavia tekijöitä eikä, se ole siten täysin karsinogeeninen. DPAA:n on myös todettu kuitenkin lisäävän oksidatiivista stressiä aiheuttaen DNA-vaurioita sekä mainittua maksan karsinogeneesiä rotilla.⁵¹

6. Pohdintaa ja avoimia kysymyksiä

Ajateltaessa kokonaisuutta, jossa kemialliset aseet upotettuna merien pohjiin ovat riskinä ympäristölle ja mereneläville, voidaan pohtia tiettyjä seikkoja. Kokeellisessa osassa tutkitun glutationikonjugaatin kohdalla herää kysymys, mikä osa glutationikonjugaatilla (DPA-SG) todellisuudessa on arvioitaessa näiden yhdisteiden ongelmia, toksisuutta sekä ympäristön saastumista upotetuista kemiallisista aseista mahdollisesti vuotavalla arseenipitoisella seoksella? Voidaanko edes teoriassa merenelävistä löytää glutationikonjugaattia eli toisin sanoen onko mahdollisesti sappeen erittynyt DPA-glutationikonjugaatti hajonnut DPA:ksi, vai ovatko DPA-löydökset peräisin Clarkeista. Voi olla todennäköistä, että DPA-SG:tä ei ole muodostunut ollenkaan. Mahdollisesti kalojen sappi voi olla myös puhdistunut DPA-SG:stä ennen kalastusta, jolloin muodostumatonta konjugaattia ei luonnollisesti voida eikä ole voitu havaita.

Tutkimuksen tärkeys

Kuinka paljon on liian paljon, mikä on myrkyllistä ja kenen näkökulmasta tarkasteltuna? Esimerkiksi Nord Stream -kaasuputkihankkeen yhteydessä tehtyjen analyysien perusteella todettiin riski kalapopulaatiolle mitättömäksi.¹⁹ Tutkimuksissa löytyneet pitoisuudet ovat erittäin pieniä ja usein alittavat määritysrajatkin. Ovatko upotetut kemialliset aseet todellinen uhka? Upotettuja aseita ei tällä hetkellä ole nykytiedon mukaan ilmeisesti järkevää nostaa meristä, eikä merenpohjan siivoaminen tule kysymykseen. Kemialliset taisteluaineet ovat kuitenkin sodankäynnin vaarallisia välineitä ja jo siksikin tärkeä tutkimuskohde globaalilla ja poliittisellakin tasolla. Uhkia merenpohjalle on kartoitettu lisää, ja esimerkiksi merenpohjassa syntyneiden täysin uusien organoarseeniyhdisteiden vaarallisuus ei ole vielä täysin selvillä. Tutkimus jatkuu.⁴⁰

Kokeellinen osuus

7. Johdanto

Työn tavoitteena oli kehittää menetelmä difenyyliarsiinihapon glutationikonjugaatin (DPA-SG) määrittämiseksi kalan sapesta nestekromatografisin ja massaspektrometrisin menetelmin. Erikoistyössä tutkittiin turskan sappea ja siihen mahdollisesti erittyvää Clark I:n ja Clark II:n hapettumistuotetta difenyyliarsiinihappoa glutationiin sitoutuneena konjugaattina. Kehitettyä menetelmää hyödynnettiin upotusalueelta kerättyjen sappinäytteiden analysoimisessa.

Näytteenkäsittelymenetelmistä kokeiltiin kolmea erilaista lähestymistapaa. Näytteenkäsittelyssä haluttiin päästä hyvään saantoon sekä helppoon ja yksinkertaiseen näytteenkäsittelymenetelmään. Näytteenkäsittelymenetelmän ideana on puhdistaa näytettä muista matriisin komponenteista, jotka mahdollisesti haittaavat analysointia.

Näytteenkäsittelymenetelmistä kokeiltiin kolmea suurta linjaa: SPE-patruunoita, dikloorimetaanipuhdistusta sekä ulossuolausta. Osittain myös kokeiltiin näiden menetelmien yhdistämistä parhaimman lopputuloksen aikaansaamiseksi.

8. Menetelmät

8.1. Analyysilaitteisto

Menetelmän kehityksessä sekä varsinaisten näytteiden analysoinnissa käytettiin nestekromatografiaa yhdistettynä massaspektrometriaan. Käytössä oli kaksi laitteistoa, joista menetelmän kehityksessä pääasiassa käytettiin Waters Aquity UPLC -nestekromatografia ja Waters Xevo TQD -kolmoiskvadrupoli-massaspektrometriä. Ionisaatiotekniikkana oli sähkösumutusionisaatio ja tandemmassaspektrometrinenä menetelmänä käytettiin valittujen reaktioiden seurantatekniikkaa (SRM, selected reaction monitoring). Analyysit tehtiin asetuksella, jossa tarkasteltiin muodostuvia positiivisia ioneja. Toisena laitteistona projektissa oli Thermo Scientific Orbitrap UHPLC-HRMS, jota käytettiin mahdollisten tulosten varmistamiseen.

Ajo-olosuhteet

Menetelmän kehitykseen ja näytteiden analysointiin käytettiin pääasiassa yhtä kolonnia. Käytössä oli Watersin XBridge-sarjan C18 BEH -käänteisfaasikolonne. Kolonnin partikkelikoko on 2,5 mikrometriä, halkaisija 2,1 mm sekä pituus 100 mm. Myös Kinetexin valmistamaa, vastaavilla parametreilla varustettua kolonnia kokeiltiin, mutta todettiin, että ei ole kuitenkaan tarvetta vaihtaa käytettyä kolonnia. Kolonnien spesifit tiedot ovat taulukoituna taulukossa 10.

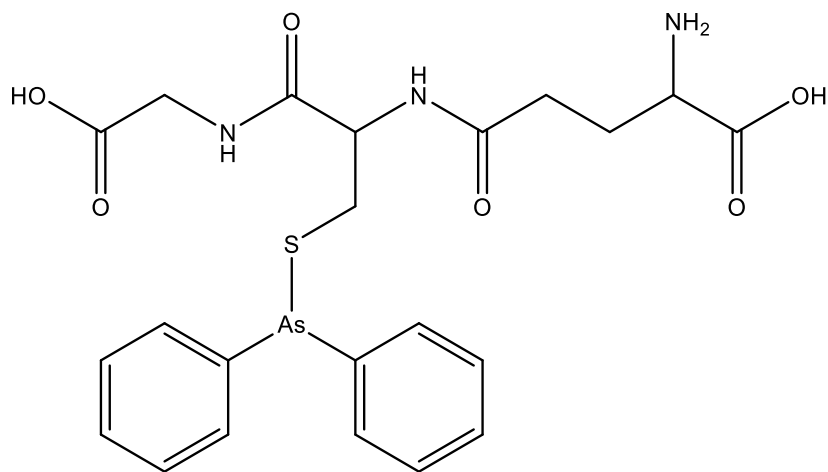
Menetelmän kehitykseen ja lopullisten näytteiden analysointiin käytetyt ajo-olosuhteet ovat taulukoituna taulukossa 10. Virtausgradienttina käytettiin gradienttiohjelmaa, jossa orgaanisen liuottimen osuus nousee ajon aikana. A-eluenttina käytettiin hapanta vettä (0,1 % HCOOH) sekä B-eluenttina hapanta asetonitriiliä (0,1 % HCOOH). Alkutilanteessa eluenttiliuos A on 95 % ja B 5 %. Ajon lopussa B-eluentin osuus on 95 % ja A-eluentin osuus 5 %.

Taulukko 10 Kolonnien spesifit tiedot sekä käytetyt ajo-olosuhteet

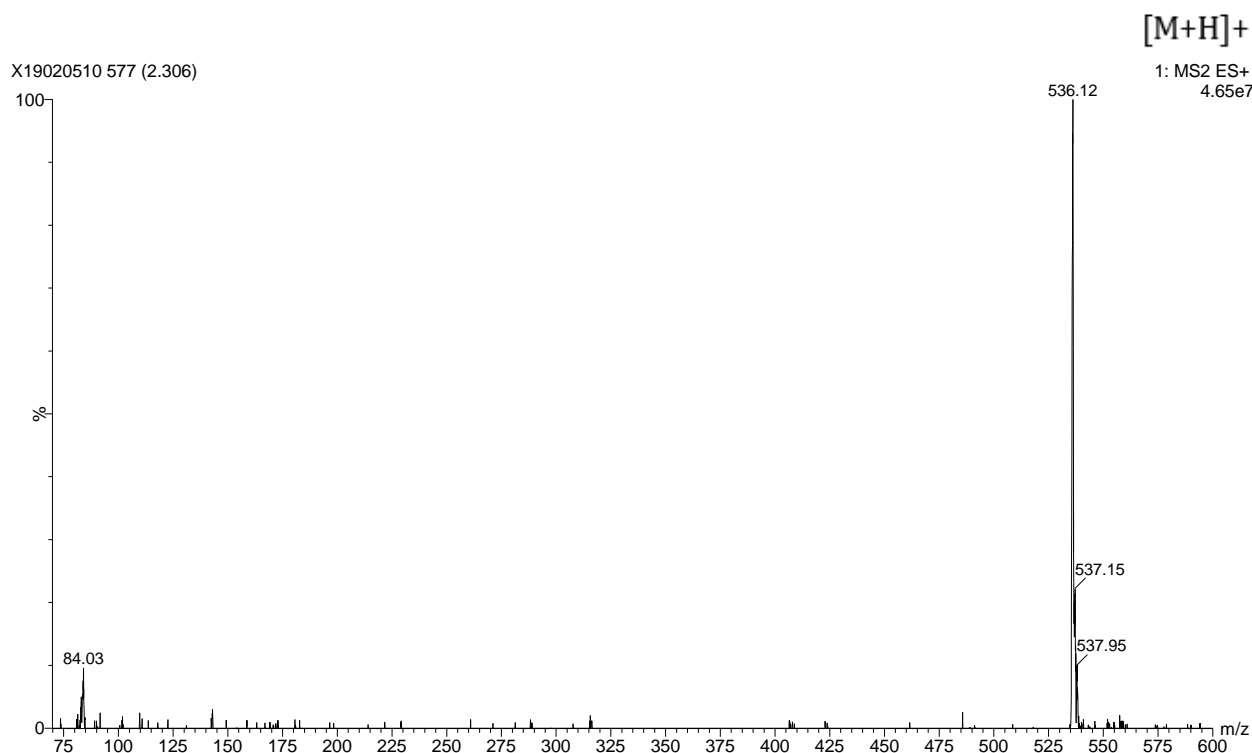
Kolonnien spesifit tiedot:
Kinetex EVO C18 2,6 µm, 2,1 x 100 mm
Xbridge BEH C18 2,5 µm, 2,1 x 100 mm XP
Ajo-olosuhteet:
Uunin lämpötila: 30 °C
Virtausnopeus: 0,4 ml/min
Injektiotilavuus 5 µl

8.2. Analyytit

Tutkimuksessa kehitettiin menetelmää difenyyliarsiinihapon glutationikonjugaatin analysoimiseksi kalan sapesta. Käytetyn referenssiyhdisteen oli syntetisoinut Hanna Niemikoski (VERIFIN). Glutathionin ominaisuuksia ja DPA-SG:n toksisuutta käsittelen tämän tutkielman kappaleessa 5. Analyytin rakennekaava on esitettyinä kuvassa 9. Esitettyinä on myös puhtasaineesta ajettu massaspektri kuvassa 10. Glutathionikonjugaatin tarkka protonoitunut massa on 536,0831 g/mol.



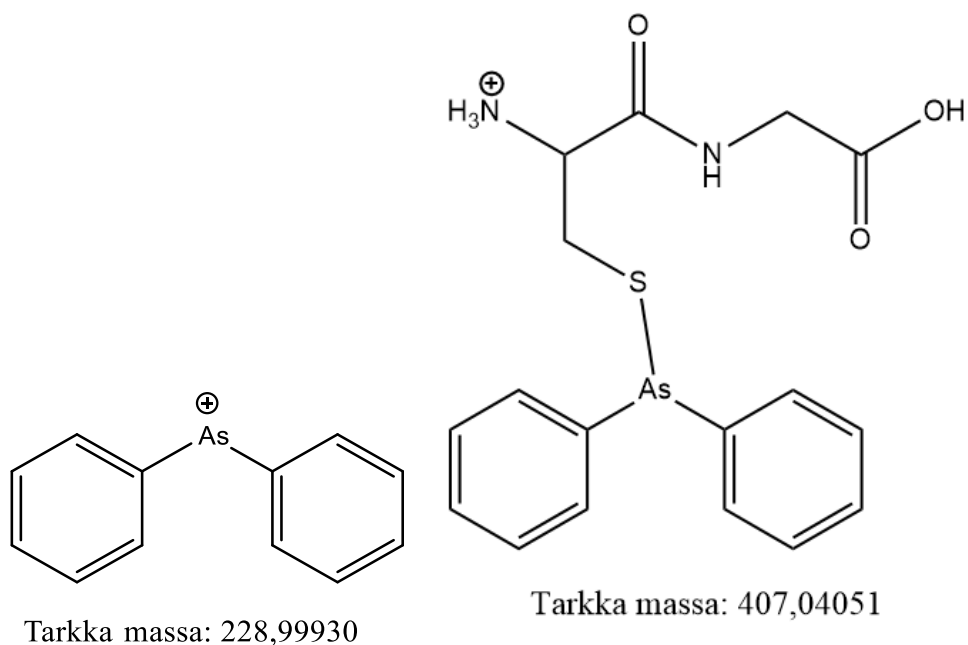
Kuva 9 DPA-SG:n rakennekaava



Kuva 10 DPA-SG:n massaspektri

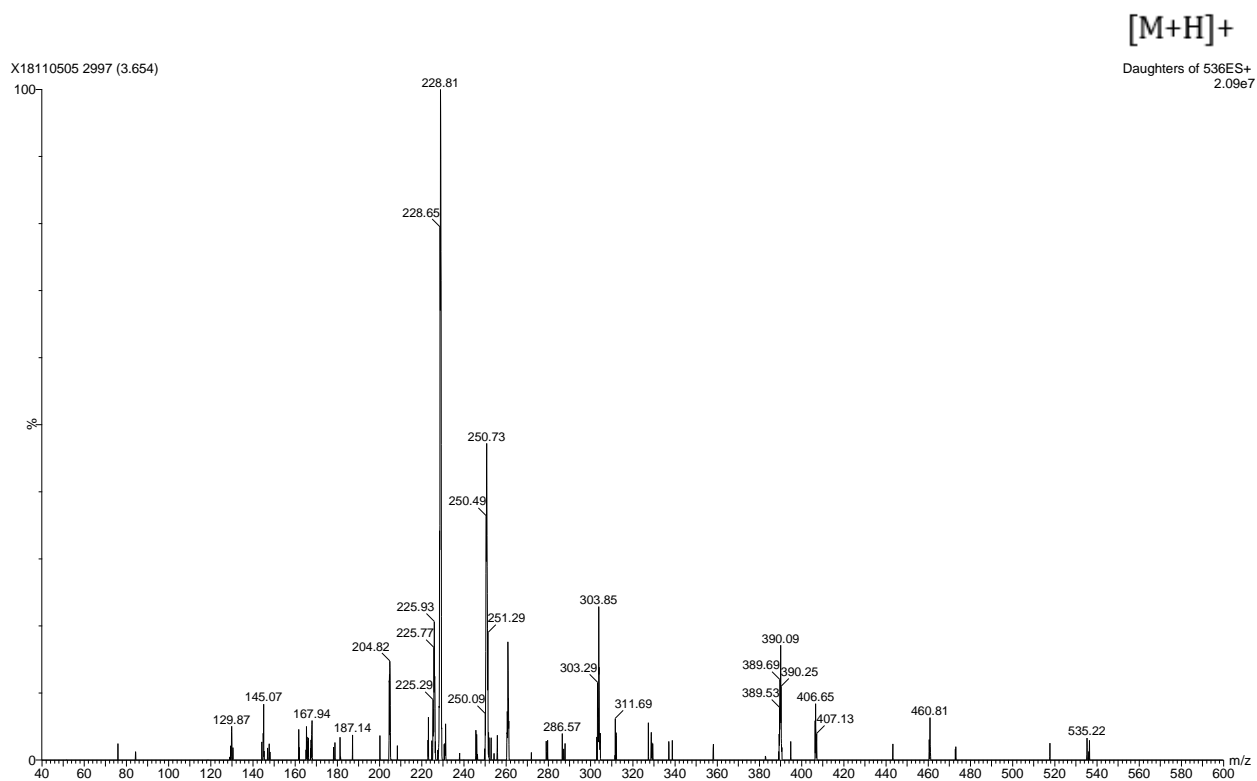
8.3. MS/MS-menetelmän tekeminen ja valitseminen

Massapektrometrissä analytti hajoaa erilaisiksi fragmenteiksi riippuen molekyylin ominaisuuksista sekä vallitsevasta törmäytysenergiasta. Massamenetelmän tekemiseksi analyttiä törmäytettiin erilaisten törmäytysenergioiden löytämiseksi. Huomattiin, että DPA-SG:n hajotessa massapektrometrissä muodostuu vahva fragmentti massaionilla 229. Toiseksi tarkkailluksi ioniksi valittiin massaioni 407. Massaspektrometriseksi SRM-menetelmäksi valittiin siis menetelmä, jossa tutkittiin näiden kahden ionin muodostumista protonoituneesta molekyyli-ionista $[M+H]^+$. Fragmentit, niiden tarkat massat sekä rakennekaavat ovat esitettynä kuvissa 11 ja 12.

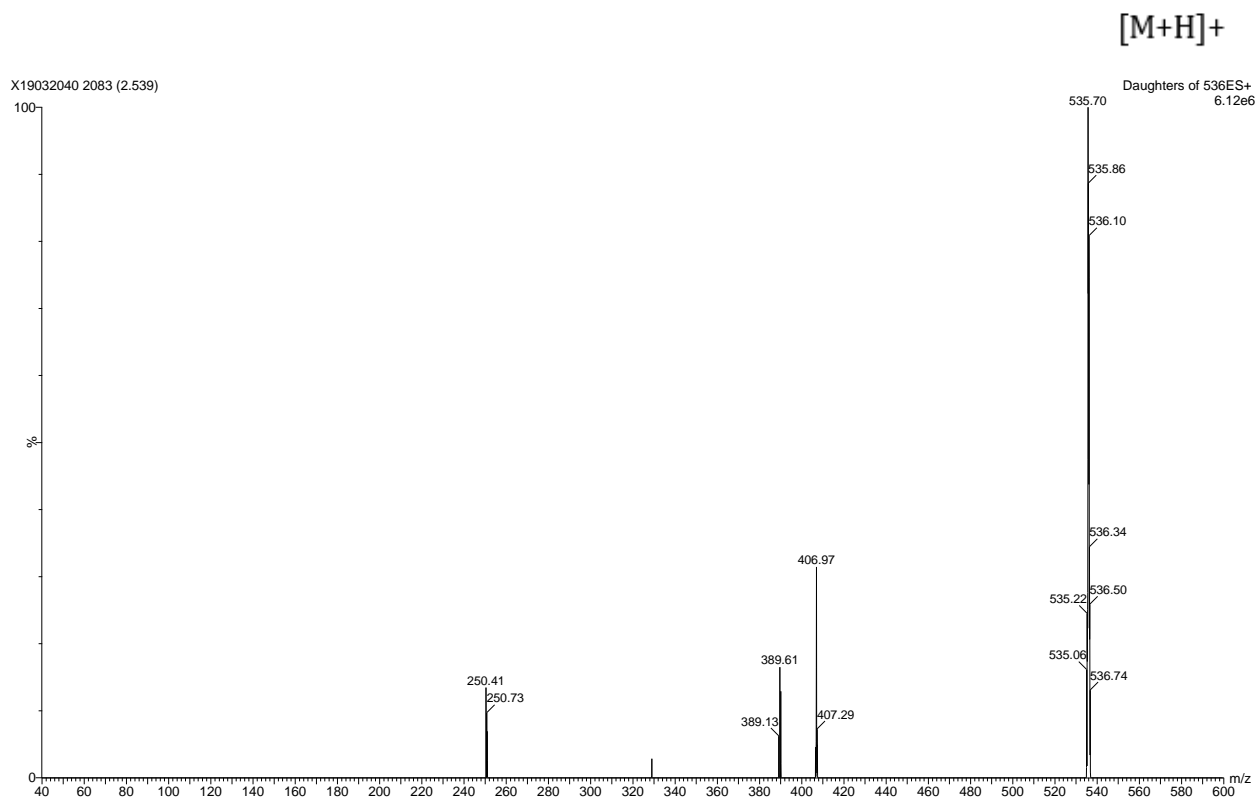


Kuva 11 Fragmentti-ionin m/z 229 rakenne Kuva 12 Fragmentti-ionin m/z 407 rakenne

Ionien intensiteettien optimoinnissa päädyttiin alussa siihen, että fragmentti-ioni m/z 407 tutkittiin törmäytysenergialla 15 eV ja fragmentti-ioni m/z 229 törmäytysenergialla 20 eV. Lopulta kuitenkin päädyttiin tarkastelemaan fragmentti-ioni m/z 407:n kohdalla 10 eV törmäytysenergiaa, fragmentti-ionin m/z 229 törmäytysenergia pysyi samana. Kuvissa 13 ja 14 on esitetty DPA-SG:n spektrit protonoiduista molekyyli-ioniesta.



Kuva 13 DPA-SG:n $[M+H]^+$, m/z 536) tytärionispektri törmäysenergialla 15 eV



Kuva 14 DPA-SG:n $[M+H]^+$, m/z 536) tytärionispektri törmäysenergialla 10 eV

8.4. Matriisi

Tutkittavien näytteen matriisi oli kalan sappineste. Sappineste on tummanvihreää paksua nestettä, joka koostuu pääasiassa vedestä, erilaisista rasvoista (mm. kolesterolista), rasvahapoista, sappisuoloista, väriaineista (mm. bilirubiini) sekä erilaisista metaboliatuotteista. Sapen pH on välillä 6,80–7,65. Tutkittu kalan sappi oli väriltään tummanvihreää ja voimakkaasti kalalle tuoksuvaa. Kuvasta 15 huomataan kalan sappinesteen vihreä väritys.

8.5. Ongelmat

Sapen luonnollisesti sisältämät sappihapot ja sappisuolat aiheuttivat ongelmia analyyseissä. Sappihapot voivat olla poolisia tai poolittomia molekyylejä. Ne aiheuttavat sähkösumutus-ionisaatiossa ionisuppressiota, jonka vaikutuksesta osa analyyttimolekyyleistä ei ionisoidu riittävän hyvin. Tässä tapauksessa tekijänä olivat matriisin sisältämät sappihapot.



Kuva 15 Kalan sappinestettä vialissa

8.6. Carryover-ongelma

Analyytin huomattiin aiheuttavan jonkinasteista carryover-ongelmaa. Luultavasti analyytin pidättäytyi kolonniin tai muualle analyysilaitteistoon, jolloin edellisen ajon analyyyttiä oli havaittavissa edelleen seuraavan ajon kohdalla. Esimerkiksi kun liuotinstandardin jälkeen injisoitiin puhdasta vettä, huomattiin edelleen liuotinstandardin analyytin aiheuttama piikki kromatogrammilla.

Carryover-ongelmaa yritettiin ratkoa pitkään ja lopulta päädyttiin ratkaisuun, jossa jokaisen ajon jälkeen ajettiin 2,5 minuutin kolonninpesuohjelma injektoiden vettä ja käyttäen eluenttina pesuliuosta, jonka koostumus on taulukoituna taulukossa 11.

Taulukko 11 Pesuliuoksen koostumus

25 %	isopropanoli
25 %	metanoli
25 %	asetoni
22,5 %	vesi
2,5 %	muurahaishappo

Kolonninpesuohjelman jälkeen, ennen varsinaista ajoa, ajettiin vielä yksi vesi-injektio. Vesi-injektiossa käytettiin eluentteina samoja liuoksia ja gradienttina samoja asetuksia kuin varsinaisissa analyyseissäkin.

8.7. Lämpötilakoe

Analyytin pysyvyyttä testattiin haihduttamalla TurboVap-haihduttimella typpivirrassa kolme rinnakkaista näytettä jokaisessa neljässä eri lämpötilatasossa. Analyytin hajoamista lämpötilan vaikutuksesta testattiin 22, 30, 40 sekä 50 °C:ssa. Näytteet oli valmistettu pipetoimalla eppendorf-putkessa 15 µl analyyyttiä sekä 1 ml hapanta metanolia (1 % HCOOH). Näytteet haihdutettiin kuiviin

typpivirrassa ja liuotettiin 200 µl vesi-metanoliseosta analyysiä varten. Koeolosuhde vastasi SPE-patruunasta eluoituvaa, haihdutettavaa fraktiota ja sen käsittelyä.

Analyytin hajoamista lämpötilan vaikutuksesta ei tässä kokeessa huomattu. Huomattiin sen sijaan, että analyytin keskimääräinen pinta-ala oli hieman suurempaa haihdutuslämpötilan noustessa.

Tämän lämpötilakokeen perusteella voitiin olettaa, että SPE-fraktion konsentroidiin voidaan käyttää myös korkeampaa lämpötilaa kuin huoneenlämpötila.

Koejärjestelyn tuloksista huomataan kokeen olleen toistettava. Suhteellinen keskihajonta, RSD, oli kaikissa lämpötilasarjoissa alle 6. Tulokset olivat yhdenmukaisia eikä poikkeavia arvoja ollut. Koejärjestelyn arvot (pinta-alat), keskiarvot (KA), keskihajonnat (KH) sekä suhteellinen keskihajonta (RSD) ovat taulukoituna taulukossa 12.

Taulukko 12 Lämpötilakoejärjestelyn tulokset taulukoituna

°C / Piikin pinta-ala	22	30	40	50
Näyte 1	474980	605824	668805	727417
Näyte 2	505725	636370	614028	656249
Näyte 3	482490	588990	582872	648569
KA	487732	610395	621902	677412
KH	13087	19611	35521	35498
RSD	2,7	3,2	5,7	5,2
Ero 22 asteen standardinäytteisiin		+ 25%	+ 22 %	+ 39 %

8.8. Projektin suunnittelu

Aikaisemman tutkimustiedon ja kokemusten perusteella päädyttiin aloittamaan menetelmän kehitys keskittyen kiinteäfaasipuhdistukseen lähtökohtaisena pääasiallisena puhdistusmenetelmänä.

Kiinteäfaasipuhdistuksessa käytetään poolisuudeltaan erilaisia liuottimia sekä kiinteää faasimateriaaleja apuna halutun analyytin erottamiseksi tutkitusta matriisista. Faasimateriaaleja on erilaisia riippuen analyytin sekä matriisin kemiallisista ominaisuuksista. Faasimateriaalin määrä patruunassa vaikuttaa myös SPE-puhdistuksen toimivuuteen. Tämän menetelmän kehityksessä testattiin muun muassa C18- sekä HLB-patruunoita. C18-patruunat perustuvat silikamolekyylissä kiinni olevaan hiiliketjuun, kun taas HLB-patruuna on polymeerirakenteinen.

SPE koostuu pääasiassa neljästä vaiheesta: kunnostus, näytteen syöttö, pesu sekä eluointivaihe. SPE:n ideana on saada analyysiä haittaavat matriisissa olevat epäpuhtaudet erotettua analyytistä ennen LC-MS/MS-analysointia.

Tässä projektissa analyytin retentiota ja suodattumista tutkittiin SPE-patruunoilla aluksi pelkästään syöttämällä analyyttiä patruunoiden läpi liuottimessa. C18-patruuna näytti toimivan toivotusti: analyytti saatiin eluoitumaan patruunan läpi, ja retentio patruunaan oli vähäistä. Kun mukaan otettiin matriisi ja matriisiin syötetty analyytti, huomattiinkin, etteivät analyytit suodatu 0,20 mikrometrin suodattimien läpi. Näytteiden suodattaminen ennen herkkään LC-MS-laitteistoon syöttämistä on tärkeää.

8.9. Dikloorimetaani

Seuraavaksi kokeiltiin SPE-puhdistuksesta täysin poikkeavaa puhdistusmenetelmää, jossa matriisia yritetään puhdistaa dikloorimetaania apuna käyttäen. Matriisin puhdistaminen dikloorimetaanilla on eräänlaista neste-nesteuuttoa. Dikloorimetaaniin uuttuu matriisista mm. rasvoja ja muita analyysissä ionisuppressiota aiheuttavia aineita. Dikloorimetaani aiheuttaa rasvojen saostumista veden ja dikloorimetaanin faasirajalle, jolloin rasvat on helppo eliminoida analyysistä.

8.10. Kiinteäfaasikokeet

Seuraavaksi haluttiin selvittää, hajoaako analyyyti dikloorimetaanissa. Kokeen toteutus ja koejärjestely oli yhdenmukainen matriisin kanssa tehtävään käsittelyyn. Kokeessa tehtiin kolme rinnakkaista näytettä, joita verrattiin standardiin ilman dikloorimetaanikäsittelyä. Koe suoritettiin vesifaasissa ilman matriisia.

Analyytin hajoamista dikloorimetaanikäsittelyssä vesiliuoksessa testattiin. Analyyyttiä 0,25 mg/ml pipetoitiin 15 µl 400 µl:aan vettä, Siihen lisättiin pari pisaraa 1 % muurahaishappoa sekä 800 µl dikloorimetaania, minkä jälkeen vialeita sekoitettiin vortex-sekoittajalla. Sen jälkeen niitä sentrifugoitiin 5 minuuttia nopeudella 9000 rpm. Tämän jälkeen vesifaasista pipetoitiin noin 200 µl vialiin LC-MS/MS-menetelmällä analysoitavaksi.

Huomattiin, ettei dikloorimetaanikäsittely hajota analyyyttiä. Koe oli toistettava, koska suhteellinen keskihajonta oli pieni. Kokeessa todettiin, että yli 90 % analyytistä oli tallella käsittelyn jälkeen.

Tämän kokeen perusteella voitiin pitää dikloorimetaanikäsittelyä jokseenkin sopivana näytteenkäsittelymenetelmänä. Kokeen tuloksia pohtiessa tulee kuitenkin ottaa huomioon kokeen tapahtuneen vesifaasissa ilman matriisin vaikutusta. Matriisi voi vaikuttaa siihen, kuinka dikloorimetaani vuorovaikuttaa analyytin kanssa sekoituksen ja sentrifugoinnin aikana. Koe kuitenkin osoittaa sen, ettei dikloorimetaani reaktiivisuudestaan huolimatta hajota analyyyttiä.

Kokeen tulokset, piikkien pinta-alat, keskiarvot, keskihajonnat sekä suhteellinen keskihajonta ovat taulukoituna taulukossa 13.

Taulukko 13 Dikloorimetaanin ja analyytin vuorovaikutussuhde

	Piikin pinta-ala
Standardi	300385
Näyte 1	277839
Näyte 2	275515
Näyte 3	289280
KA	280878
KH	6016
RSD	2,1
Näytteiden pinta-alojen keskiarvo % standardista	94

Dikloorimetaanipuhdistusta optimoitiin kokeilemalla, kuinka monta kertaa puhdistus olisi järkevää tehdä. Jokaisessa koesarjassa verrattiin näytteenkäsittelyn saantoja matriisistandardiin. Koejärjestely oli seuraava: 200 µl:aan sappea pipetoitiin 10 µl 0,25 mg/ml analyttiliuosta. Näytteisiin lisättiin 200 µl vettä, ja ne tehtiin happamaksi neljällä tipalla 1 % muurahaishappoa. Näytteitä puhdistettiin 800 µl dikloorimetaania, minkä jälkeen näytteitä sekoitettiin vortex-sekoittajalla 30 sekuntia ja sentrifugoitiin 5 minuuttia nopeudella 9000 rpm. Puhdistus tehtiin 1–4 kertaa ja saantoja vertailtiin. Jokaisessa koesarjassa oli kolme näytettä sekä kolme matriisistandardia. Matriisistandardin näytteet käsiteltiin samalla tavalla, mutta analyytti pipetoitiin näytteisiin vasta ennen analyysiä. Puhdistuksen jälkeen näytteet suodatettiin 0,20 µm:n suodattimilla ja siirrettiin vialeihin LC-MS-analyysiä varten. Dikloorimetaanipuhdistuksen kohdalla suodattumisongelmia ei ollut.

Huomattiin, että kaksinkertaisella puhdistuksella päästään hieman parempiin tuloksiin, kuin jos puhdistus tehdään vain kerran. Puhdistuksen saantoprosentti parani 30 %:sta 38 %:iin. Näytteenkäsittelyn saanto kolmin- ja nelinkertaisessa puhdistuksessa jäi selvästi huonommaksi.

Kolminkertaisella puhdistuksella päästiin 19 % saantoon kuten myös nelinkertaisella puhdistuksella.

Taulukoissa 14–17 on taulukoituna tuloksia, kun puhdistus on tehty 1–4 kertaa. Taulukoissa on piikkien pinta-alat, matriisistandardien pinta-alat, keskiarvot, keskihajonnat ja RSD laskettuina.

Taulukko 14 Koesarja 1

	Yksi puhdistus		
Näyte 1	10868	Matriisistandardi 1	28548
Näyte 2	6012	Matriisistandardi 2	25752
Näyte 3	7236	Matriisistandardi 3	25997
<i>KA</i>	<i>8039</i>		<i>26766</i>
<i>KH</i>	<i>2526</i>		<i>1548</i>
<i>RSD</i>	<i>31,4</i>		<i>5,8</i>
Näytteenkäsittelyn saanto %:		30	

Taulukko 15 Koesarja 2

	Kaksi puhdistusta		
Näyte 1	10036	Matriisistandardi 1	25213
Näyte 2	12893	Matriisistandardi 2	26771
Näyte 3	9255	Matriisistandardi 3	32950
<i>KA</i>	<i>10728</i>		<i>28311</i>
<i>KH</i>	<i>1915</i>		<i>4092</i>
<i>RSD</i>	<i>17,9</i>		<i>14,5</i>
Näytteenkäsittelyn saanto %		38	

Taulukko 16 Koesarja 3

	Kolme puhdistusta		
Näyte 1	7872	Matriisistandardi 1	38658
Näyte 2	7074	Matriisistandardi 2	37754
Näyte 3	6219	Matriisistandardi 3	36658
KA	7055		37690
KH	827		1002
RSD	11,7		2,7
Näytteenkäsittelyn saanto %:	19		

Taulukko 17 Koesarja 4

	Neljä puhdistusta		
Näyte 1	5755	Matriisistandardi 1	35451
Näyte 2	5782	Matriisistandardi 2	34810
Näyte 3	8487	Matriisistandardi 3	33458
KA	6675		34573
KH	1570		1017
RSD	23,5		2,9
Näytteenkäsittelyn saanto %:	19		

Kaksinkertainen dikloorimetaaniuuttokoe toistettiin ja päästiin samankaltaisiin tuloksiin. Muurahaishappoa käytettiin nyt kaksi tippaa, mutta tällä kertaa vahvempaa 2 % muurahaishappoa. Tässä kokeessa kokeiltiin näytteen konsentroitua typpihaihduuttimella ja näytteen liuottamista 200 µl metanoli-vesiseosta suhteessa 1:1. Taulukossa 18 on esitetty piikkien pinta-alat, matriisistandardien pinta-alat, keskiarvot, keskihajonnat ja suhteellinen keskihajonta laskettuina.

Taulukko 18 Toinen koesarja, kaksinkertainen uutto

Toinen koesarja kaksinkertaisella uutolla			
	Pinta-ala		Pinta-ala
Näyte 1	7262	Matriisistandardi 1	20219
Näyte 2	8160	Matriisistandardi 2	21554
Näyte 3	8195	Matriisistandardi 3	20447
Keskiarvo	7872		20740
Keskihajonta	529		714
RSD	6,7		3,4
% matriisistandardista	38		

Dikloorimetaanuuuttoa haluttiin optimoida lisää. Uudessa koesarjassa kokeessa käytettiin 50 µl 2 % muurahaishappoa, ja matriisistandardin näytteiden tilavuus tarkistettiin. Menetelmän parannusten jälkeen huomattiin menetelmän näytteenkäsittelyn saannon olevan parempi kuin aikaisemmin oli todettu.

Massaspektrometrin asetuksiin tehtiin muutos, ja massaspektrometriseen menetelmään otettiin nyt myös mukaan analyytin hajoamistuote difenyyliarsiinihappo, DPA. On otettava huomioon, että näytteen standardiliuos sisälsi itsessään jo DPA:ta. Liuotinstandardiin vertaamalla huomataan kuitenkin matriisivaikutuksen eli ionisuppression olevan huomattava, noin 95 %. Taulukoissa 19–21 on esitetty dikloorimetaanikäsittelyllä tehdyt näytteet, matriisistandardinäytteet sekä vertailuksi liuotinstandardinäytteet. Taulukoissa ovat esitettyinä sekä DPA-SG:n että DPA:n osalta piikkien pinta-alat, keskiarvot, keskihajonnat ja RSD:t. Kuvassa 16 on esitetty ionikromatogrammit reaktioille m/z 263→m/z 152 ja m/z 263→m/z 141. DPA:n protonoitunut molekyyli-ioni on m/z 263.

Taulukko 19 Dikloorimetaanikäsittely

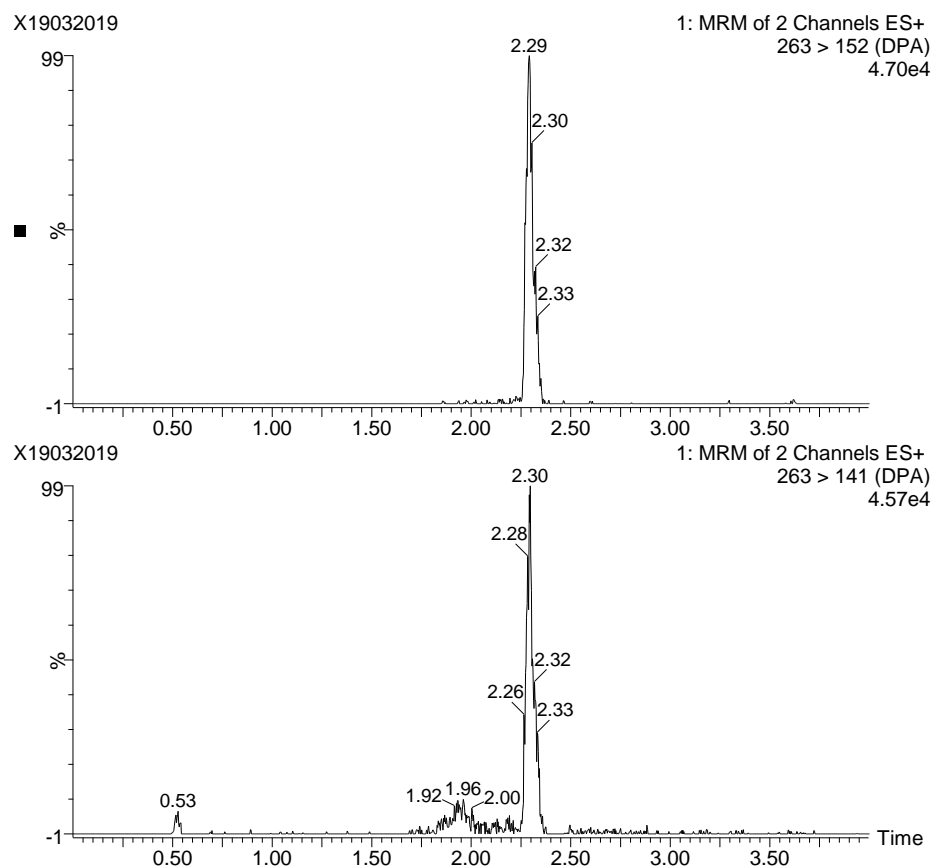
	Dikloorimetaanikäsittely	
	DPA-SG	DPA
Näyte 1	9985	57115
Näyte 2	10341	64755
Näyte 3	9105	66169
KA	9810	62680
KH	636	4871
RSD%	6,5	7,8

Taulukko 20 Matriisistandardinäytteet

	Matriisistandardinäytteet	
	DPA-SG	DPA
Näyte 4	19080	70950
Näyte 5	18146	73846
Näyte 6	17631	76393
KA	18286	73730
KH	735	2723
RSD%	4,0	3,7

Taulukko 21 Liutinstandardinäytteet

	Liutinstandardinäytteet	
	DPA-SG	DPA
Näyte 7	344005	223635
Näyte 8	352491	240204
Näyte 9	351691	235692
KA	349396	233177
KH	4686	8566
RSD%	1,3	3,7



Kuva 16 DPA:n ionikromatogrammit valituille reaktioille (m/z 263→ m/z 152 ja m/z 263→ m/z 141)

Dikloorimetaaniuutto yhdistettynä C18-patruunoihin

Dikloorimetaaniuuttoa haluttiin testata vielä yhdistettynä C18 SPE -patruunoihin. Näytteenkäsittelyssä tehtiin ensin kaksinkertainen dikloorimetaanikäsittely, samalla tavalla kuten raportissa edellä on kuvattu. Tämän jälkeen näyte ajettiin C18 SPE -patruunan läpi. Patruuna kunnostettiin aluksi 1 ml metanolilla, minkä jälkeen näyte syötettiin patruunaan. Näytteelle suoritettiin pesuvaihe patruunassa 1 ml:lla vettä, minkä jälkeen näyte eluoiitiin patruunasta hapanta metanolia käyttäen (1 % HCOOH).

C18-patruunoita kokeiltiin dikloorimetaanikäsittelyn kanssa käyttäen 50 asteen haihdutuslämpötilaa. Näytteenkäsittelyn saannoksi saatiin samaa luokkaa oleva 23 % kuin 22

asteen haihdutuksella. Taulukossa 22 on piikkien pinta-alat, matriisistandardien pinta-alat, keskiarvot, keskihajonnat ja RSD laskettuina.

Taulukko 22 Dikloorimetaaniuutto yhdistettynä C18-patruunoihin

	Dikloorimetaanipuhdistus ja SPE		Matriisistandardi
Näyte 1	4723	Näyte 1	25740
Näyte 2	5539	Näyte 2	27119
Näyte 3	7865	Näyte 3	27504
KA	6042	KA	26788
KH	1630	KH	928
RSD %	27	RSD %	3,5

SPE-puhdistusta hieman optimoitiin ja pesuvaiheessa käytettiin 20-prosenttista metanolia. Parhaimmat tulokset SPE-puhdistuksesta saatiin kaksinkertaisella dikloorimetaanipuhdistuksella käyttäen 20 % metanolipesua sekä 50 asteen haihdutuslämpötilaa. Näytteenkäsittelyn saannoksi saatiin 25 %. Taulukossa 23 on piikkien pinta-alat, matriisistandardien pinta-alat, keskiarvot, keskihajonnat ja RSD laskettuina.

Taulukko 23 Dikloorimetaanipuhdistus ja SPE

	Dikloorimetaanipuhdistus ja SPE		Matriisistandardi
Näyte 1	9106	Näyte 1	36608
Näyte 2	10648	Näyte 2	45658
Näyte 3	10343	Näyte 3	37278
KA	10032	KA	39848
KH	667	KH	4117
RSD %	7	RSD %	10,3

Molemmissa kokeissa huomattiin kuitenkin piikkien pinta-alojen käsittelyn jälkeen verrattuna liuotinstandardin pinta-alaan olevan vain noin prosentin luokkaa, eli matriisivaikutus oli huomattava. Tämän vuoksi dikloorimetaani- sekä SPE-puhdistus hylättiin tämän projektin kohdalla. Yhdistetty puhdistus, jossa käytettiin dikloorimetaania, sekä SPE-patruunoita, osoittautui liian työlääksi ja monivaiheiseksi.

*Johtopäätökset kiinteäfaasiuutosta sekä dikloorimetaanipuhdistuksesta
näytteenkäsittelymenetelminä tälle analyytille ja matriisille:*

Erikoistyon aikana testattiin erilaisia SPE-patruunoita, liuottimia ja eluutiotilavuuksia. Matriisia yritettiin myös puhdistaa heksaanilla sekä tolueenilla siksi, että näytteet eivät aluksi suodattuneet 0,20 µm suodattimien läpi edes C18-puhdistuksen jälkeen. Heksaanikäsittely auttoi suodatinongelmaan hieman, mutta suodatinongelma poistui, kun siirryttiin dikloorimetaaniuuttoon.

Ionisuppressio koettiin yleisesti suureksi ongelmaksi tätä analyysimenetelmää kehitettäessä. Huomattiin kuitenkin dikloorimetaanin saostavan rasvoja sekä muita ionisuppressiota aiheuttavia yhdisteitä pois matriisista. Dikloorimetaanikäsittely auttoi siis ionisuppressio-ongelmaan vähentäen ionisuppressiota. Parhaimpiin näytteenkäsittelyn saantoihin päästiin kaksinkertaisella dikloorimetaanipuhdistuksella ilman SPE-puhdistusta (38 %) SPE-patruunoiden (C18 100 mg). Dikloorimetaanikäsittelyllä päästiin vain n. 24 % näytteenkäsittelyn saantoon. Ilman dikloorimetaanipuhdistusta näytteenkäsittelyn saanto jäi vain noin 2 %. Kuitenkin SPE- ja dikloorimetaanikäsittelyllä piikkien pinta-alat verrattuna liuotinstandardiin jäivät olemattomiksi (1-3 %), joten matriisivaikutus oli molemmissa menetelmissä huomattava; toisin sanoen ionisuppressio oli yli 95 %.

Huomattiin, että metaboliitti hajoaa kuitenkin herkästi DPA:ksi käsittelyjen ja säilytyksen aikana. Ehkä analyytti hajoaa matriisin vaikutuksesta kolonnissakin? Analyytin hajoamista ei kuitenkaan tapahdu standardin kohdalla (metanoli-vesi). Voi siten olla, että tätä metaboliittia on ylipäättään vaikea analysoida sellaisenaan kalan sapesta.

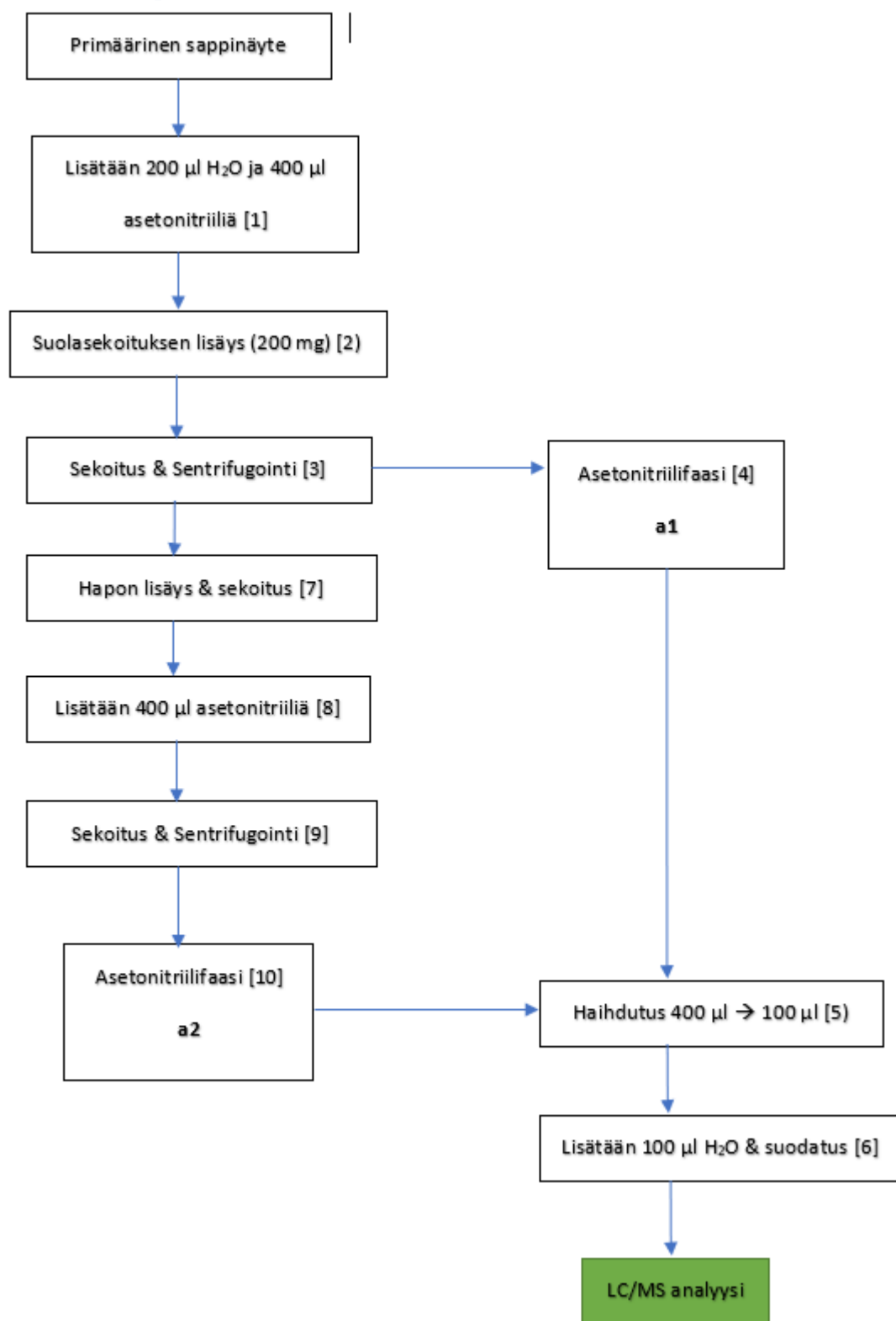
Dikloorimetaaniuutto sekä SPE-patruunat hylättiin ja siirryttiin seuraavaan puhdistusmenetelmään.

8.11. Ulossuolaus

Ulossuolausta voidaan käyttää esimerkiksi pestisidien analysoimiseksi osana QuEChERS -näytteenkäsittelymenetelmää^{52 53}. Ulossuolauksessa käytetään ideaa, jossa asetonitriiliin ja veden välille muodostuu kaksi faasia, kun seos tehdään kylläiseksi. Toisiinsa liukenevat asetonitriili ja vesi muodostavat ulossuolauksessa suolan lisäyksen takia kaksi eri faasia. Ulossuolauksessa ensimmäinen asetonitriilifaasi hävitettiin, koska sen ei todettu sisältävän haluttua analyyyttiä.

Ulossuolauksessa käytettiin suolaseosta, jossa oli 4 g magnesiumsulfaattia sekä 1 g natriumkloridia. Liuos tehtiin happamaksi käyttämällä laimeaa suolahappoliuosta (0,5 M) jonka jälkeen näytettä sekoitettiin kevyesti. Sitten liukseen lisättiin uusi asetonitriilifaasi. Ionisena suolana oleva analyyyti vapautuu näin ollen hapon lisäyksen seurauksena suolastaan ja on siten liukoinen asetonitriiliin. Ulossuolauksen huomattiin vähentävän ionisuppressiota 95 %:sta noin 40 %:iin. Ulossuolausta kokeiltiin erilaisin suhtein veden ja asetonitriilin määrää muuttaen, jolloin lopullinen näytteenkäsittelymenetelmä alkoi hahmottua. Lopullinen näytteenkäsittelykaavio on esitettyä kuvassa 17.

8.12. Lopullinen näytteenkäsittelymenetelmä



Kuva 17 Lopullinen näytteenkäsittelykaavio

1. Sulatettuun 200 µl sappinäytteeseen lisätään 200 ml MilliQ-vettä sekä 400 µl asetonitriiliä (HPLC-laatu). Sekoitus voidaan tehdä esimerkiksi 2 ml:n Eppendorf-putkessa.
2. Näytteeseen lisätään 200 mg suolasekoitusta, jossa on 4 g magnesiumsulfaattia ja 1 g natriumkloridia.
3. Näytettä sekoitetaan kevyesti vortex-sekoittajalla ja sentrifugoidaan neljä minuuttia (4000 rpm) matalassa 4 °C lämpötilassa.
4. Näytteen ylempi faasi (a1) pipetoidaan talteen Pasteur-pipetillä.
5. Asetonitriili konsentroidaan noin 100 µl tilavuuteen typpivirrassa huoneenlämmössä.
6. Konsentroituu näytteeseen lisätään 100 µl MilliQ-vettä ja näyte suodatetaan 0,20 µm suodattimilla.
7. Loput näytteestä tehdään happamaksi suolahappoliuoksella (0,5 M) ja sitä vorteksoidaan kevyesti.
8. Happamaan näytteeseen lisätään 400 µl asetonitriiliä.
9. Näytettä sekoitetaan vortex-sekoittajalla kymmenen sekuntia, minkä jälkeen sitä sentrifugoidaan neljä minuuttia (4000 rpm) matalassa 4 °C lämpötilassa.
10. Setrifugoinnin jälkeen ylin asetonitriilikerros käsitellään kuten kohdissa 5-6.

8.13. Validointi

Lopulliseksi näytteenkäsittelymenetelmäksi valittu ulossuolausmenetelmä validoitiin ennen menetelmän käyttämistä ja ennen varsinaisten DAIMON-näytteiden analysointia. Menetelmä validoitiin vain MS/MS-menetelmän osalta, ei koko näytteenkäsittelyn osalta. Menetelmän validointiin sisältyi useita vaiheita, ja validointi suunniteltiin hyvin ennen sen aloittamista. Validointi suoritettiin sekä DPA-SG:n ja TPAox:in osalta; validointia ei siis suoritettu DPA:n osalta, koska DPA on myös DPA-SG:n hajoamistuote. Menetelmän validointiin sisältyi puhdasaineesta valmistetun kantaliuoksen pitoisuuden kvantitointi NMR:llä, alhaisimman pitoisuustason löytäminen, testistandardisuorien ajo, varsinaisten validointisuorien ajo sekä menetelmään liittyvät saantokokeet.

Validointi suoritettiin kolmena perättäisenä päivänä, joista jokaisena ajettiin kolme kuuden pisteen standardisuoraa, joista kullekin laskettiin suhteellinen keskihajonta sekä korrelaatiokerroin. Analyytti pipetoitiin blank-matriisista valmistettuihin validointinäytteisiin näytteenkäsittelyvaiheiden jälkeen. Validoinnin suunnitteluvaiheessa päädyttiin validoimaan DPA-SG tasolla 15-40 ng/ml sekä TPAox tasolla 2-12 ng/ml.

Alhaisimman tason löytäminen

Ennen validoinnin aloittamista haluttiin selvittää, kuinka alhaiselle pitoisuustasolle menetelmällä mahdollisesti päästäisiin. Näytteitä tehtiin eri pitoisuustasoilla alkaen 2,5 ng/ml. Kvantitointi- sekä varmistusionien intensiteettejä seurattiin. Kvantitointi-ionin reaktio oli m/z 536 \rightarrow m/z 229 ja varmistusionin reaktio m/z 536 \rightarrow m/z 407. Alhaisimmaksi pitoisuustasoksi haluttiin valita sellainen taso, jossa varmistusionin reaktio on myös selvästi tunnistettavissa. Lopulta alhaisimmaksi pitoisuustasoksi konjugaatin tapauksessa valittiin 15 ng/ml. Validointi päätettiin suorittaa välillä 15–40 ng/ml. Pitoisuustasoina olivat 15, 20, 25, 30, 35 ja 40 ng/ml.

Sama toistettiin TPAox:in tapauksessa. Tämän analyytin tapauksessa päädyttiin suorittamaan validointi välillä 2–12 ng/ml pitoisuustasoilla 2, 4, 6, 8, 10 ja 12 ng/ml.

MS/MS-menetelmän muuttaminen

Varmistusionin siirtymän m/z 536 \rightarrow m/z 407 törmäytysenergiaa muutettiin 15 eV:stä 10 eV:iin paremman herkkyyden saavuttamiseksi. Lopulta päädyttiin 10 eV:n törmäytysenergiaan erilaisia törmäytysenergioita testaamalla.

9. Tulokset

9.1. Validointitulokset

Taulukoissa 24 ja 25 on esitetty validointitulokset DPA-SG:n sekä TPAox:in osalta koskien tätä kyseistä LC-MS/MS-menetelmää. Taulukossa esitetyt arvot ovat pyöristettyjä tuloksia, laskuissa käytettiin alkuperäisiä arvoja. Taulukoissa on kalibraatiosuoran pisteiden konsentraatiot ja lasketut konsentraatiot, keskiarvot, RSD:t, virhe, korrelaatiokerroin sekä otos. Validaatio tehtiin vain MS/MS-menetelmälle. Validointi tehtiin siten, että blank-matriisiin pipetoitiin haluttu konsentraatio analyyyttiä. Menetelmän saannoksi määritettiin 10 % DPA-SG:n osalta sekä 19 % TPAox:lle. Menetelmän saannon määrittämiseksi analysoitiin kuusi rinnakkaista näytettä, joihin analyyytti pipetoitiin ennen näytteenkäsittelyn aloittamista. Kuvassa 18 on esitettynä esimerkkinä saantokokeen kromatogrammi, jossa näkyvät kaikki halutut analyytit: DPA-SG, DPA sekä TPA.

Taulukko 24 DPA-SG:n validointitulokset

DPA-SG	Kalibraatiostandardi (ng/ml)						
Kalibraatiosuoran piste (ng/ml)	15	20	25	30	35	40	Korrelaatiokerroin
Keskiarvo (ng/ml)	14,4	20,0	24,7	29,8	34,5	38,5	
RDS (%)	11,1	4,5	4,7	7,8	4,4	10,1	0,985
Virhe	4,0	0,1	1,3	0,6	1,4	3,7	
n	9	9	9	9	9	9	

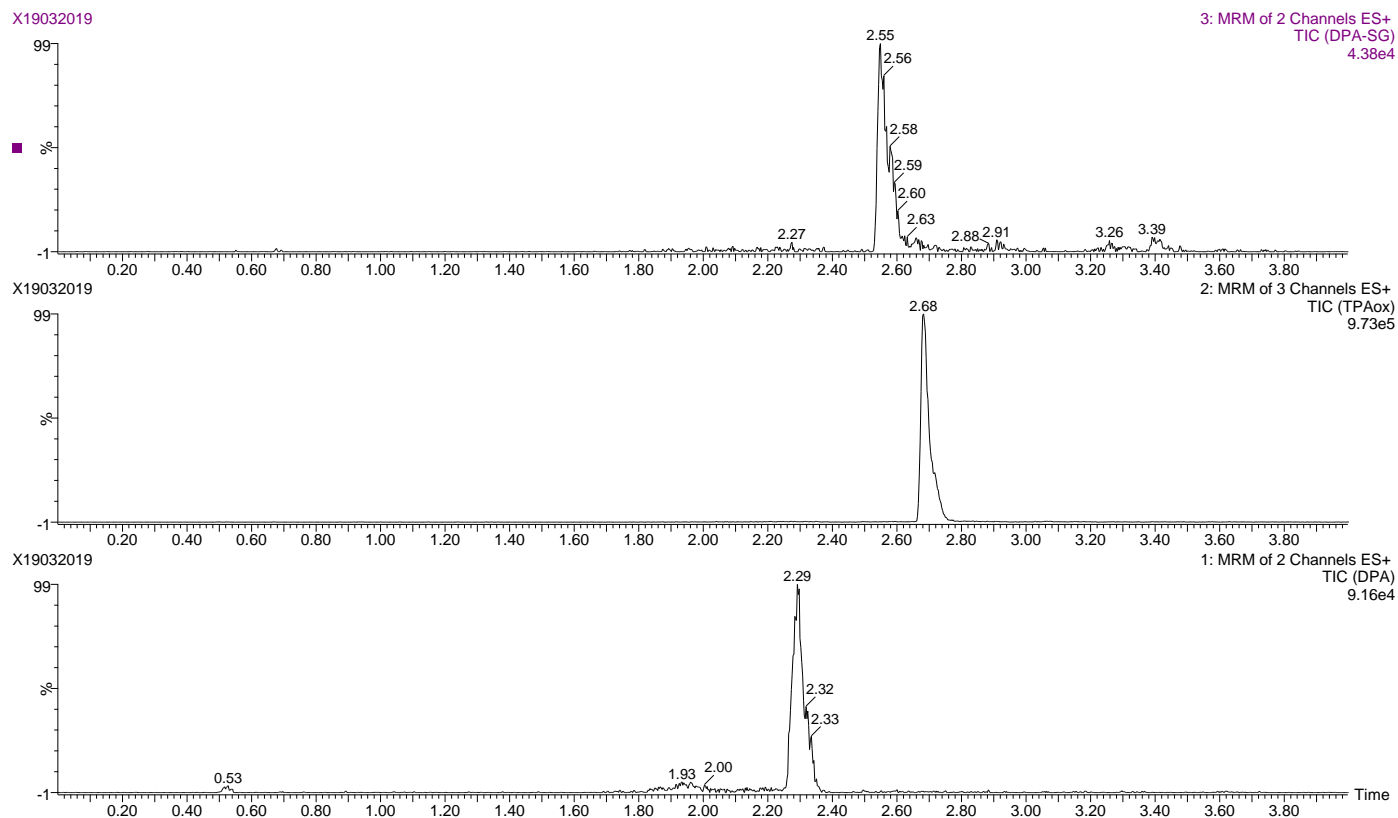
Taulukko 25 TPAox:in validointitulokset

TPAox	Kalibraatiostandardi (ng/ml)						
Kalibraatiosuoran piste (ng/ml)	2	4	6	8	10	12	Korrelaatiokerroin
Keskiarvo (ng/ml)	2,1	3,8	5,9	8,2	10,2	11,7	
RDS (%)	12,7	7,4	5,4	3,2	2,5	2,3	0,989
Virhe	4,1	4,1	2,0	2,2	2,5	2,1	
n	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	

Taulukossa 26 on listattuna määritysmenetelmän osoitusraja (LOD) sekä määritysraja (LOQ) laskettuna eri analyyyteille sapesta määritettynä. Arvot ovat ng/ml.

Taulukko 26 Määritysmenetelmän osoitus- sekä määritysrajat

	ng/ml	
Analyytti	LOD	LOQ
DPA-SG	11,9	39,6
TPAox	1	3,4

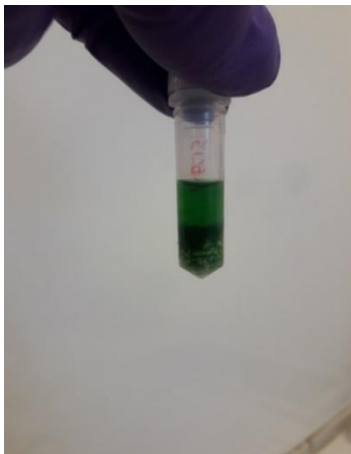


Kuva 18 DPA-SG, TPAox sekä DPA havaittuna valituilta kromatogrammeilta. Seuratut reaktiot olivat: DPA-SG m/z 536 -> m/z 407 ja m/z 536 -> m/z 229, TPAox m/z 323 -> m/z 227, m/z 323 -> m/z 154, m/z 323 -> m/z 77 ja DPA m/z 263 -> m/z 152 ja m/z 263 -> m/z 141

9.2. Näytteen analysointi

Yhteensä analysoitiin 31 sappinäytettä. Näytteet käsiteltiin tarkalleen sivulla 65 esitetyn näytteenkäsittelykaavion mukaan (kuva 17). Näytteistä analysoitiin faasi a1 sekä faasit a2. Näytteet oli kerätty DAIMON-projektin aikana upotusalueelta, johon arseenia sisältäviä kemiallisia aseita on tietävästi upotettu. Näytteet oli säilytetty syväjäässä alle $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa analysointipäivään asti. Referenssinäytteet oli kerätty Gdanskinlahden- referenssialueelta.

Näytteiden käsittelyssä noudatettiin varovaisuutta ja äärimmäistä tarkkuutta. Matriisin ja analyytin epästabiilin luonteen vuoksi näytteitä pidettiin jäähauteessa koko näytteenkäsittelyn ajan sekä käytettiin kylmiä liuottimia näytteenkäsittelyn aikana. Näytteet käsiteltiin kahtena perättäisenä päivänä. Näytteet analysoitiin pienissä erissä analyysin nopeatahtisen luonteen vuoksi. Kuvassa 19 on havainnollistettu näytteen analysointia.

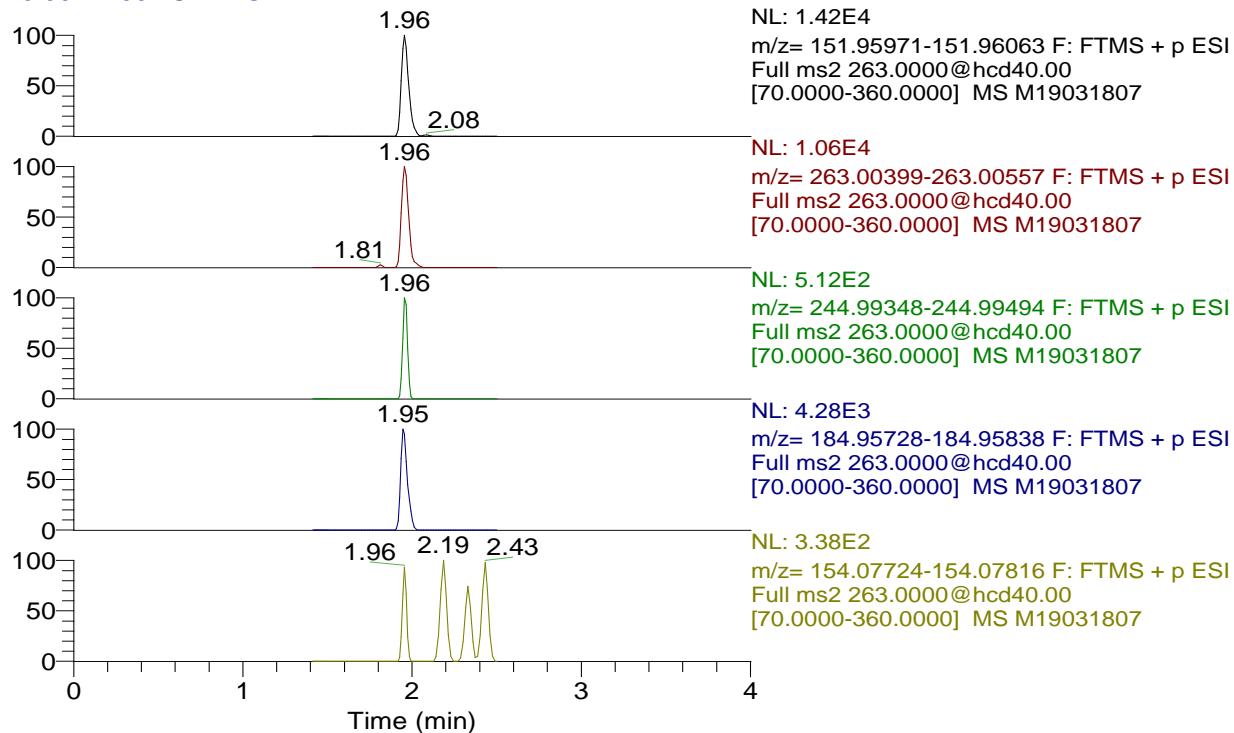


Kuva 19 Näytteen analysointia

9.3. Löydökset

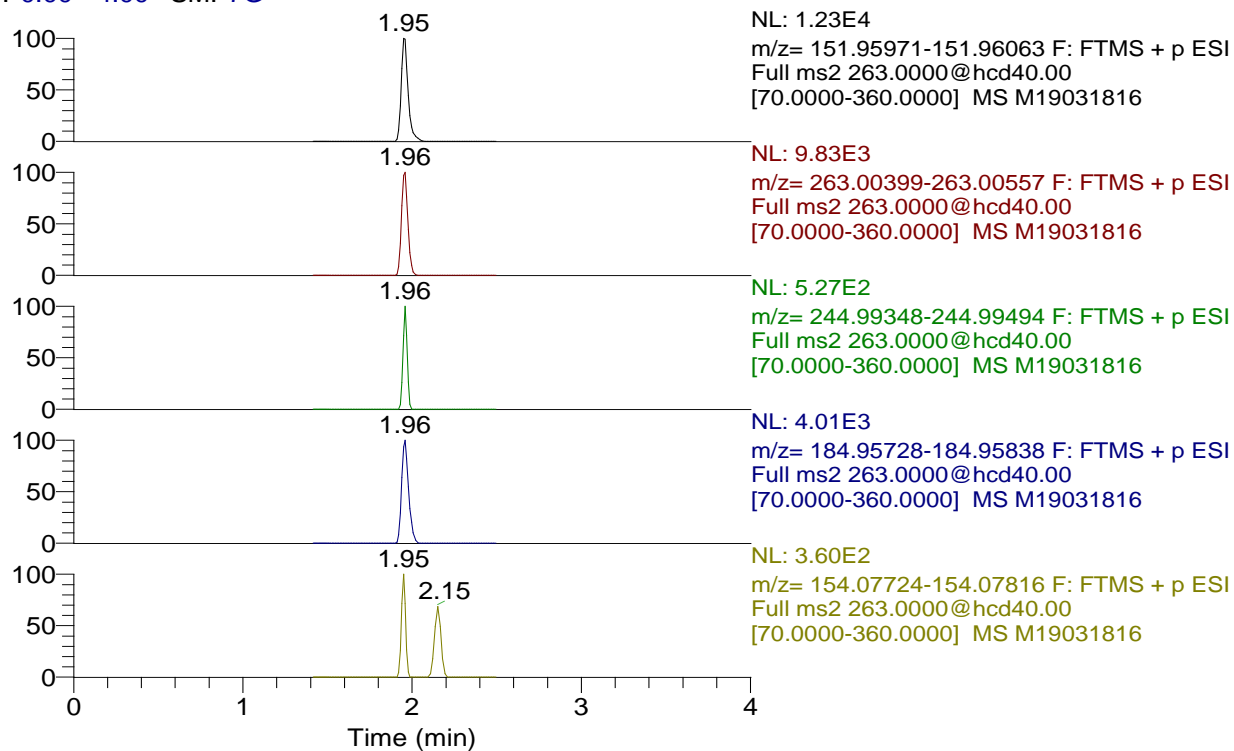
Difenyyliarsiinihapon glutationikonjugaattia ei sellaisenaan löydetty analysoiduista sappinäytteistä. Trifenyyliarsiinin hapettunutta muotoa (TPAoxia) ei sitäkään havaittu. DPA:ta sen sijaan löydettiin sappinäytteistä käyttäen korkean resoluution massaspektrometriä (LC-HRMS/MS). Kuvissa 20–21 on esitettynä DPA-löydökset näytteestä 4597. Näytteen molemmat faasit olivat positiivisia DPA:lle. Varmistus yhdisteen löytymisestä tehtiin Orbitrap Fusionilla. Kuvissa 20-21 nähdään myös DPA:lle tyypilliset fragmentit m/z 151,9597, m/z 263,0040, m/z 244,9935, m/z 184,9573 ja m/z 154,0772.

RT: 0.00 - 4.00 SM: 7G



Kuva 20 Näyte 4597 faasi a2. Valitut ionikromatogrammit LC-HRMS/MS-tekniikalla.

RT: 0.00 - 4.00 SM: 7G



Kuva 21 Näyte 4597 faasi a1. Valitut ionikromatogrammit LC-HRMS/MS-tekniikalla

10. Yhteenveto

Arseenipitoisia kemiallisia taisteluaineita upotettiin sotien jälkeen meriin. Ne ovat tutkimusaiheina erilaisissa artikkeleissa. Yhdisteitä sekä niiden ongelmia on tutkittu erilaisin lähtökohdin ja näkökulmin. Yhdisteet ovat myös osana erilaisia projekteja osana tutkimuksen kohteena olevista kemikaaleista. Pääosin kuitenkin yhdisteet ja niiden mahdolliset ongelmat nyt ja tulevaisuudessa ovat huolenaiheina. Yhdisteitä on tutkittu erilaisin analyysimenetelmin erilaisista matriiseista. Analyysimenetelmät ovat pääosassa olleet kromatografisia ja massaspektrometrisiä menetelmiä. Kaasu ja pääosassa nestekromatografiaa on hyödynnetty onnistuneesti yhdisteiden analyysissä.

Pro gradu -projektin alussa asetetut tavoitteet täyttyivät. Uutta menetelmää arseenia sisältävien kemiallisten aseiden määrittämiseksi kalan sappinesteestä saatiin kehitettyä, sekä tämän projektin aikana parhaaksi havaittua menetelmää testattua. Menetelmää päästiin käyttämään myös varsinaisten upotusalue näytteiden analysoimiseksi, niin kuin oli ennalta aikataulutettu. Nyt kehitetty menetelmä luo pohjaa vastaavien yhdisteiden ja yhdisteryhmien analysoimiseksi vastaavanlaisista matriiseista tulevaisuudessa.

Arvostetussa sekä akkreditoidussa VERIFINin laboratoriossa työskentely on antanut näkökulmia, kokemusta, ideaa sekä elämän varrelle evästyä siihen, mitä mahdollisesti analyttisen kemistin työ pitää sisällään.

11. Lähdeluettelo

1. Tørnes, J. A., Opstad, A. M. & Johnsen, B. A. Determination of organoarsenic warfare agents in sediment samples from Skagerrak by gas chromatography-mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* **356**, 235–246 (2006).
2. Johnson, N. H., Larsen, J. C. & Meek, E. *Historical Perspective of Chemical Warfare Agents. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents: Second Edition* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-800159-2.00002-6.
3. Radke, B., Jewell, L., Piketh, S. & Namieśnik, J. Arsenic-based warfare agents: Production, use, and destruction. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **44**, 1525–1576 (2014).
4. Croddy, E., Wirtz, J. J., and Larsen, J. A. *Weapons of mass destruction: An Encyclopedia of Worldwide Policy, Technology, and History*. vol. I (Santa Barbara, CA: ABC-CLIO Inc, 2005).
5. HELCOM. Chemical Munitions Dumped in the Baltic Sea. Report of the ad hoc Expert Group to Update and Review the Existing Information on Dumped Chemical Munitions in the Baltic Sea (HELCOM MUNI), Baltic Sea Environment Proceeding (BSEP) No. 142. 128 (2013).
6. Niemikoski, H., Soderstrom, M., Kiljunen, H., Ostin, A. & Vanninen, P. Identification of Degradation Products of Sea-Dumped Chemical Warfare Agent-Related Phenylarsenic Chemicals in Marine Sediment. *Anal. Chem.* **92**, 4891–4899 (2020).
7. Bearden, D. M. U . S . Disposal of Chemical Weapons in the Ocean : *Defense* (2007).
8. McElroy, M. Ocean Dumping of Chemical Munitions: Environmental Effects in Arctic Seas. 231 (1997).
9. Deng, H. & Evans, P. O. Social and environmental aspects of abandoned chemical weapons in China. *Nonproliferation Rev.* **4**, 101–108 (1997).
10. Carton, G. & Jagusiewicz, A. Historic disposal of munitions in U.S. and European coastal

waters, how historic information can be used in characterizing and managing risk. *Mar. Technol. Soc. J.* **43**, 16–32 (2009).

11. Silva, J. A. K. & Chock, T. Munitions integrity and corrosion features observed during the HUMMA deep-sea munitions disposal site investigations. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **128**, 14–24 (2016).
12. Briggs, C., Shjegstad, S. M., Silva, J. A. K. & Edwards, M. H. Distribution of chemical warfare agent, energetics, and metals in sediments at a deep-water discarded military munitions site. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **128**, 63–69 (2016).
13. Department of Defence. Chemical Warfare Agent Sea Dumping off Australia. 44 (2003).
14. Sanderson, H., Fauser, P., Thomsen, M. & Sørensen, P. B. Screening level fish community risk assessment of chemical warfare agents in the Baltic Sea. *J. Hazard. Mater.* **154**, 846–857 (2008).
15. Höher, N., Turja, R., Brenner, M., Nyholm, J. R., Östin, A., Leffler, P., Butrimavičienė, L., Baršienė, J., Halme, M., Karjalainen, M., Niemikoski, H., Vanninen, P., Broeg, K., Lehtonen, K. K. & Berglind, R. Toxic effects of chemical warfare agent mixtures on the mussel *Mytilus trossulus* in the Baltic Sea: A laboratory exposure study. *Mar. Environ. Res.* **145**, (2019).
16. Sanderson, H., Fauser, P., Thomsen, M. & Larsen, J. B. Weight-of-evidence environmental risk assessment of dumped chemical weapons after WWII along the Nord-Stream gas pipeline in the Bornholm Deep. *J. Hazard. Mater.* **215–216**, 217–226 (2012).
17. Nawala, J., Czupryński, K., Popiel, S., Dziedzic, D. & Bełdowski, J. Development of the HS-SPME-GC-MS/MS method for analysis of chemical warfare agent and their degradation products in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* **933**, 103–116 (2016).
18. Popiel, S., Nawala, J. & Czupryński, K. Preparation and application of sol-gel acrylate and methacrylate solid-phase microextraction fibres for gas chromatographic analysis of organoarsenic compounds. *Anal. Chim. Acta* **837**, 52–63 (2014).
19. Sanderson, H., Fauser, P., Rahbek, M. & Larsen, J. B. Review of environmental exposure

concentrations of chemical warfare agent residues and associated the fish community risk following the construction and completion of the nord stream gas pipeline between Russia and Germany. *J. Hazard. Mater.* **279**, 518–526 (2014).

20. Missiaen, T., Söderström, M., Popescu, I. & Vanninen, P. Evaluation of a chemical munition dumpsite in the Baltic Sea based on geophysical and chemical investigations. *Sci. Total Environ.* **408**, 3536–3553 (2010).
21. Zhu, M., Tu, C., Zhang, H., Luo, Y. & Christie, P. Simultaneous determination of diphenylarsinic and phenylarsinic acids in amended soils by optimized solvent extraction coupled to HPLC-MS/MS. *Geoderma* **270**, 109–116 (2016).
22. Hanaoka, S., Nagasawa, E., Nomura, K., Yamazawa, M. & Ishizaki, M. Determination of diphenylarsenic compounds related to abandoned chemical warfare agents in environmental samples. *Appl. Organomet. Chem.* **19**, 265–275 (2005).
23. Ishii, K., Tamaoka, A., Otsuka, F., Iwasaki, N., Shin, K., Matsui, A., Endo, G., Kumagai, Y., Ishii, T., Shoji, S., Ogata, T., Ishizaki, M., Doi, M. & Shimojo, N. Diphenylarsinic acid poisoning from chemical weapons in Kamisu, Japan. *Ann. Neurol.* **56**, 741–745 (2004).
24. Kinoshita, K., Shida, Y., Sakuma, C., Ishizaki, M., Kiso, K., Shikino, O., Ito, H., Morita, M., Ochi, T. & Kaise, T. Determination of diphenylarsinic acid and phenylarsonic acid, the degradation products of organoarsenic chemical warfare agents, in well water by HPLC-ICP-MS. *Appl. Organomet. Chem.* **19**, 287–293 (2005).
25. Terzic, O., Bartenbach, S. & de Voogt, P. Determination of Lewisites and their hydrolysis products in aqueous and multiphase samples by in-sorbent tube butyl thiolation followed by thermal desorption-gas chromatography-full scan mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1304**, 34–41 (2013).
26. Terzic, O., Swahn, I., Cretu, G., Palit, M. & Mallard, G. Gas chromatography-full scan mass spectrometry determination of traces of chemical warfare agents and their impurities in air samples by inlet based thermal desorption of sorbent tubes. *J. Chromatogr. A* **1225**, 182–192 (2012).

27. Niemikoski, H., Söderström, M. & Vanninen, P. Detection of Chemical Warfare Agent-Related Phenylarsenic Compounds in Marine Biota Samples by LC-HESI/MS/MS. *Anal. Chem.* **89**, 11129–11134 (2017).
28. Lastumäki, A., Turja, R., Brenner, M., Vanninen, P., Niemikoski, H., Butrimavičienė, L., Stankevičiūtė, M. & Lehtonen, K. K. Biological effects of dumped chemical weapons in the Baltic Sea: A multi-biomarker study using caged mussels at the Bornholm main dumping site. *Mar. Environ. Res.* **161**, (2020).
29. Niemikoski, H., Koske, D., Kammann, U., Lang, T. & Vanninen, P. Studying the metabolism of toxic chemical warfare agent-related phenylarsenic chemicals in vitro in cod liver. *J. Hazard. Mater.* **391**, 122221 (2020).
30. Komulainen, H., Koulu, M. & Tuomisto, J. Metallit ja metalloidit. in *Farmakologia ja toksikologia* 1085–1098 (Kustannus Oy Medicina, 2007).
31. Liu, Q., Lu, X., Peng, H., Popowich, A., Tao, J., Uppal, J. S., Yan, X., Boe, D. & Le, X. C. Speciation of arsenic – A review of phenylarsenicals and related arsenic metabolites. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **104**, 171–182 (2018).
32. Vahter, M. Species differences in the metabolism of arsenic compounds. *Appl. Organomet. Chem.* **8**, 175–182 (1994).
33. Suzuki, K. T., Mandal, B. K. & Ogra, Y. Speciation of arsenic in body fluids. *Talanta* **58**, 111–119 (2002).
34. Kinoshita, K., Ochi, T., Suzuki, T., Kita, K. & Kaise, T. Glutathione plays a role in regulating the formation of toxic reactive intermediates from diphenylarsinic acid. *Toxicology* **225**, 142–149 (2006).
35. Yehiayan, L., Pattabiraman, M., Kavallieratos, K., Wang, X., Boise, L. H. & Cai, Y. Speciation, formation, stability and analytical challenges of human arsenic metabolites. *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 1397–1405 (2009).
36. Ochi, T., Suzuki, T., Isono, H. & Kaise, T. In vitro cytotoxic and genotoxic effects of

- diphenylarsinic acid, a degradation product of chemical warfare agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **200**, 64–72 (2004).
37. Ochi, T., Kinoshita, K., Suzuki, T., Miyazaki, K., Noguchi, A. & Kaise, T. The role of glutathione on the cytotoxic effects and cellular uptake of diphenylarsinic acid, a degradation product of chemical warfare agents. *Arch. Toxicol.* **80**, 486–491 (2006).
 38. Sanderson, H., Fauser, P., Thomsen, M., Vanninen, P., Soderstrom, M., Savin, Y., Khalikov, I., Hirvonen, A., Niiranen, S., Missiaen, T., Gress, A., Borodin, P., Medvedeva, N., Polyak, Y., Paka, V., Zhurbas, V. & Feller, P. Environmental hazards of sea-dumped chemical weapons. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 4389–4394 (2010).
 39. Sanderson, H., Fauser, P., Thomsen, M. & Sørensen, P. B. PBT screening profile of chemical warfare agents (CWAs). *J. Hazard. Mater.* **148**, 210–215 (2007).
 40. Vanninen, P., Östin, A., Bełdowski, J., Pedersen, E. A., Söderström, M., Szubska, M., Grabowski, M., Siedlewicz, G., Czub, M., Popiel, S., Nawąła, J., Dziedzic, D., Jakacki, J. & Pączek, B. Exposure status of sea-dumped chemical warfare agents in the Baltic Sea. *Mar. Environ. Res.* **161**, (2020).
 41. Baršienė, J., Butrimavičiienė, L., Grygiel, W., Stunženas, V., Valskiene, R., Greiciunaite, J. & Stankevičiute, M. Environmental genotoxicity assessment along the transport routes of chemical munitions leading to the dumping areas in the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* **103**, 45–53 (2016).
 42. Baršienė, J., Butrimavičiienė, L., Grygiel, W., Lang, T., Michailovas, A. & Jackunas, T. Environmental genotoxicity and cytotoxicity in flounder (*Platichthys flesus*), herring (*Clupea harengus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) from chemical munitions dumping zones in the southern Baltic Sea. *Mar. Environ. Res.* **96**, 56–67 (2014).
 43. Kumari, B., Kumar, V., Sinha, A. K., Ahsan, J., Ghosh, A. K., Wang, H. & DeBoeck, G. Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. *Environ. Chem. Lett.* **15**, 43–64 (2017).
 44. Sanderson, H., Fauser, P., Thomsen, M. & Sørensen, P. B. Human health risk screening due to consumption of fish contaminated with chemical warfare agents in the Baltic Sea. *J.*

Hazard. Mater. **162**, 416–422 (2009).

45. Nakamagoe, K., Fujizuka, N., Koganezawa, T., Shimizu, K., Takiguchi, S., Horaguchi, T., Ishii, K. & Tamaoka, A. Residual central nervous system damage due to organoarsenic poisoning. *Neurotoxicol. Teratol.* **37**, 33–38 (2013).
46. Kita, K., Suzuki, T. & Ochi, T. Down-regulation of glutaminase C in human hepatocarcinoma cell by diphenylarsinic acid, a degradation product of chemical warfare agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **220**, 262–270 (2007).
47. Umezu, T., Nakamiya, K., Kita, K., Ochi, T., Shibata, Y. & Morita, M. Diphenylarsinic acid produces behavioral effects in mice relevant to symptoms observed in citizens who ingested polluted well water. *Neurotoxicol. Teratol.* **34**, 143–151 (2012).
48. Guan, L., Harada, N., Ono, Y., Takahashi, T., Fujii, K., Liu, X. & Nonaka, M. Effects of diphenylarsinic acid on bacterial and archaeal community structures in an anaerobic paddy soil. *Geoderma* **195–196**, 243–250 (2013).
49. Yamaguchi, T., Gi, M., Yamano, S., Fujioka, M., Tatsumi, K., Kawachi, S., Ishii, N., Doi, K., Kakehashi, A. & Wanibuchi, H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp. Toxicol. Pathol.* **69**, 1–7 (2017).
50. Yamaguchi, T., Gi, M., Fujioka, M., Doi, K., Okuno, T., Kakehashi, A. & Wanibuchi, H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 104 weeks. *J. Toxicol. Sci.* **42**, 475–483 (2017).
51. Wei, M., Yamada, T., Yamano, S., Kato, M., Kakehashi, A., Fujioka, M., Tago, Y., Kitano, M. & Wanibuchi, H. Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **273**, 1–9 (2013).
52. He, Z., Wang, Y., Wang, L., Peng, Y., Wang, W. & Liu, X. Determination of 255 pesticides in edible vegetable oils using QuEChERS method and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 1017–1030 (2017).

53. Chamkasem, N., Ollis, L. W., Harmon, T., Lee, S. & Mercer, G. Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 2315–2329 (2013).